

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 130

**MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE COMMUNE
DE DOSAGE DES FONGICIDES
BIPHENYLE, BCM, O-PHENYL-PHENOL ET THIABENDAZOLE
DANS LES AGRUMES**

Résultats de l'enquête effectuée sur 108 lots de fruits

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 28 Février 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zeinab HAMADI

née le 25 Février 1950

à BEYROUTH (Liban)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 130

**MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE COMMUNE
DE DOSAGE DES FONGICIDES
BIPHENYLE, BCM, O-PHENYL-PHENOL ET THIABENDAZOLE
DANS LES AGRUMES**

Résultats de l'enquête effectuée sur 108 lots de fruits



THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 28 Février 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zeinab HAMADI

née le 25 Février 1950

à BEYROUTH (Liban)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 120

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODOLOGIE COMMUNE
DE L'ÉTUDE DES FONCTIONS
DIPHENYL, DE 6-O-MÉTHYLPHENOL ET THIAZEPANOL
DANS LES AGUINES
Résultats de l'analyse effectuée sur 108 lots de fruits



THÈSE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'enseignement et de recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 28 février 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zelma HAMADI
née le 25 février 1950
à BEYRUTH (Liban)

DIRECTEURS DES UNITÉS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

À LA DATE DU 25 JANVIER 1977

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE. : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de Médecine ALEXIS CARREL.. : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de Médecine LYON-NORD..... : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART,
M.C.A.

U.E.R. de Médecine SUD-OUEST..... : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques : Monsieur le Pr
Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de Techniques de
réadaptation..... : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de Biologie Humaine..... : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD,
M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON,
Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de Sciences Odontologiques. : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de Mathématiques..... : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de Physique..... : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de Chimie-Biochimie..... : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de Sciences de la Nature... : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de Sciences Physiologiques. : Mademoiselle le Pr
Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de Physique Nucléaire..... : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1..... : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2..... : Monsieur J. GALLET,
Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de Lyon..... : Monsieur Guy MONNET,
Astronome Adjoint

U.E.R. de Mécanique..... : Mademoiselle le Pr
Geneviève COMTE-BELLOT

A MES PARENTS

A MES SOEURS ET FRERES

A MA SOEUR ZAMZAM

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

*Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage
de ma reconnaissance, de mon admiration et de ma
profonde affection.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545310_0003

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CHAMBON

Durant nos études, il nous a accueillie dans son laboratoire et nous a initiée à la recherche avec beaucoup de patience et de sollicitude.

Il a inspiré notre travail et il l'a guidé de ses précieux conseils.

Sa grande culture scientifique, son courage, son esprit critique, ont été pour nous d'un précieux secours pour conduire ce travail.

Nous avons vivement apprécié ses qualités humaines exceptionnelles et son extrême gentillesse.

Que ce travail lui apporte l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre haute considération.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CARRAZ

Il a eu l'extrême bienveillance de nous accueillir à l'Institut Pasteur et de nous faire bénéficier de sa grande expérience de chercheur, de sa précision scientifique et de son extrême gentillesse.

Nous le remercions sincèrement de la confiance qu'il a bien voulu nous accorder en acceptant de juger notre travail.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre profonde reconnaissance et de notre respectueuse admiration.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J.-J. VALON

Nous le remercions de l'attention qu'il nous a porté en acceptant de faire partie du Jury de notre thèse.

Enseignant de grande valeur, esprit érudit, il nous a encouragés dans nos études.

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude .

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. REYNAUD

Il nous a reçus avec une extrême gentillesse.

Nous le remercions sincèrement de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

Nous tenons à lui assurer notre profonde reconnaissance.

MONSIEUR A. BERTRAND, Ingénieur Chimiste

Il nous a accueillie, ainsi que toute son équipe, avec une très grande amabilité dans son laboratoire de recherches.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance d'avoir bien voulu siéger dans notre Jury de thèse.

A MADAME CHAMBON, Maître-Assistant au Laboratoire
de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon :

Elle s'est toujours montrée très attentive à l'évolution de nos travaux.

Nous avons apprécié sa gentillesse et sa disponibilité à notre égard.

A TOUS LES MEMBRES DU LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE
de la Faculté de Pharmacie de Lyon :

Leur collaboration a été précieuse et leur accueil a été pour nous amical et sympathique.

Nous tenons à leur exprimer l'assurance de notre meilleur souvenir.

NOUS REMERCIONS LA SOCIETE PEPRO-PHILAGRO,
en particulier :

MONSIEUR THIZY, Directeur du Centre de Recherches, qui nous a reçu avec une extrême amabilité et nous a permis d'avoir accès à sa bibliothèque et à ses laboratoires.

MADAME PEGAZ qui nous a fourni les documents nécessaires.

Qu'ils trouvent ici l'expression d'une reconnaissance sincère.

NOUS TENONS A REMERCIER LES MEMBRES
DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON,
en particulier :

MADAME VEYSSEYRE, Chef du Service d'Immuno-
logie, pour ses grandes qualités humaines et
sa sympathie à notre égard durant notre
séjour à Lyon.

MONSIEUR FORGEMONT, Directeur Administratif,
pour sa grande compréhension.

MADAMOISELLE SCHWARTZ, pour l'aide qu'elle
nous a apportée en assurant avec rapidité
et efficacité tout le travail de secrétariat.

P L A N

I. INTRODUCTION.

II. TRAVAUX ANTERIEURS.

1. Les traitements antifongiques.
2. Problèmes soulevés par l'emploi des antifongiques.
3. Propriétés physico-chimiques.
4. Mécanisme d'action des fongicides.
5. Rapport structure - activité.
6. Transformation biologique et physico-chimique.
7. Etude de la pénétration et de la rémanence.
8. Dosage des fongicides.
9. Toxicologie.
10. Aspect législatif.
11. Résultats d'enquêtes.

III. TRAVAUX PERSONNELS.

1. Recherche d'une méthode d'analyse applicable aux fongicides d'agrumes.
 - 1.1. Choix d'un solvant de migration avec les étalons de référence.
 - 1.2. Recherche d'une technique d'extraction et de séparation des fongicides extraits d'agrumes.
 - 1.2.1. Cas du BCM
 - 1.2.2. Cas du thiabendazole.
 - 1.2.3. Cas du biphényle.
 - 1.2.4. Cas de l'O-phényl-phénol.
 - 1.3. Techniques adoptées.
 - 1.4. Schéma général.
2. Résultats de l'enquête.
 - 2.1. Echantillonnage.
 - 2.2. Résidus dans les agrumes.
 - 2.3. Classification des échantillons en fonction de leur provenance.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

I. INTRODUCTION

La production et la consommation des agrumes augmentent continuellement et, avec elles, les quantités de fruits entreposés et transportés à longue distance.

Mais les moisissures susceptibles de s'attaquer aux agrumes sont assez nombreuses et provoquent de nombreuses pertes, d'où l'importance économique et nutritionnelle d'une conservation judicieuse des agrumes par l'utilisation des fongicides.

Après les sels de bore (borax), le biphényle, l'O-phényl-phénate, le 2-aminobutane, qui possèdent essentiellement une action curative, ce fut la découverte, ces dernières années, de nouveaux fongicides de synthèse à action systémique et dont les plus connus sont : le bénomyl, le thiabendazole et le méthyl-thiophanate, qui assurent une protection parfaite des fruits.

Mais la présence des résidus de fongicides sur les agrumes a créé de nombreux problèmes et a suscité des recherches dans des domaines très variés.

En 1972 et 1973, en France, les laboratoires d'analyse du Service de Répression des Fraudes ont pu mettre en évidence, sur certains fruits, des taux de résidus dépassant les doses admissibles (8^{ter}).

Bien que de nombreuses techniques soient actuellement praticables, nous avons axé les travaux de cette thèse sur la recherche d'une méthodologie permettant une extraction simultanée de plusieurs fongicides qui seront ensuite séparés par chromatographie sur couches minces, le dosage final s'effectuant par spectrographie ultraviolette.

La méthode, une fois mise au point, sera appliquée au dosage des fongicides : benzimidazole carbamate de méthyl, biphényle, thiabendazole et O-phényl-phénol, dans les écorces d'agrumes vendus dans la région lyonnaise.

II. TRAVAUX ANTERIEURS

1. LES TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES

1.1... TRAITEMENT CHIMIQUE -

Les champignons parasites des agrumes après récolte sont nombreux, plusieurs dizaines d'espèces, mais dans la pratique c'est à quelques-unes seulement qu'on peut attribuer plus de 90 % des dégâts observés. Ce sont :

- *Penicillium digitatum*
- *Penicillium italicum*,
- *Diplodia natalensis*,
- *Phomopsis citri*,
- *Oospora citri aurantii*,
- *Alternaria citri*,
- *Phytophthora citrophthora*, (112).

Contre ces agents de pourriture, quelques fongicides sont utilisés pour traiter les agrumes. Le binéphyle, connu depuis plus de 40 ans, persiste toujours sur le marché, mais n'est pas actif contre tous ces agents. C'est pourquoi, on a cherché d'autres fongicides depuis quelques années. Les plus utilisés actuellement sont :

- le biphényle qui conserve toujours une large diffusion ;
- l'orthophényl-phénol et son sel de sodium ;
- le thiabendazole ;
- le bénomyl et son métabolite le BCM (le méthyl-2-benzimidazole carbamate) ;
- le 2-aminobutane ;

(9, 81, 82, 83, 124, 125, 206, 207, 202, 41, 226, 29).

Ces produits sont utilisés de différentes manières.

1.1.1. BAINS -

Cette technique est très couramment employée. On protège les fruits en les trempant dans une solution antifongique (173).

Ce procédé est peu employé pour le biphényle à cause de son insolubilité dans l'eau mais, par contre, utilisé pour le thiabendazole et le bénomyl (64).

Une étude a montré que l'application de thiabendazole en vaporisation ou trempage, dans une solution cireuse à 1 pour mille, était plus efficace que le trempage dans un bain aqueux (195).

Mais d'autres études ont montré qu'un trempage des oranges dans une solution à 3 pour mille n'avait plus aucun effet sur les pourritures à cause de la sélection des souches résistantes (87).

Des essais faits à l'Université de Californie (ECKERT et KOLBEZEN, 1963 et 1971) sur de nombreuses variétés d'agrumes ont montré qu'une émulsion de cire contenant environ 0,5 % de thiabendazole donnerait des résidus suffisants pour inhiber le développement et la sporulation de *Penicillium digitatum* à la surface d'oranges en train de pourrir (61, 62).

Des associations de fongicides sont parfois utilisées. Des travaux ont montré que le meilleur procédé pour lutter contre les moisissures bleues et vertes des agrumes est de tremper ces fruits dans une solution à 0,5 % de O-phényl-phénate de sodium, suivi d'un traitement par le thiabendazole dans une solution cireuse (100).

De même, une association de TBZ et de folpet est plus efficace que lorsque chaque fongicide est utilisé tout seul (106).

D'autres associations de fongicides ont été essayées et se sont montrées très efficaces contre un certain nombre de champignons (91, 67, 68).

1.1.2. PULVERISATIONS -

Le thiabendazole à 1 pour mille en suspension aqueuse est utilisé pour les traitements de pulvérisation destinés à enrayer les premières attaques fongiques.

Par contre, une concentration de 5 à 10 pour mille empêche toute sporulation à la surface des fruits pourris (112).

Le bénomyl est encore plus actif à l'égard de *Penicillium* que le thiabendazole puisqu'il agit à des concentrations moindres (112) : 0,5 pour mille pour la prévention des attaques et 0,4 % pour celle de la sporulation (30).

1.1.3. ENDUITS CIREUX -

Ce procédé n'est pas très efficace. Les cires fongicides inhibent les échanges cellulaires en eau, sucres totaux et sucres réduits. Les dégâts sont donc plus lents à apparaître, mais pendant ce temps les champignons s'adaptent à ces conditions plus dures et, dès que le fongicide n'agit plus, la formation et la croissance des conidies sont très rapides, ce qui rend le traitement inefficace (190).

Dans les années 50, des études ont été faites sur le diphényle et elles ont montré que le développement des pourritures, inhibé au départ, était très fortement augmenté dès que le diphényle cessait d'agir (173).

On a cherché à améliorer ce procédé en lavant les fruits avec une solution d'antifongique avant d'appliquer la cire. Sur des citrons, le lavage avec une solution

aqueuse de thiabendazole à 1 pour mille, puis l'application de cire à 0,05 pour mille, ont permis une protection totale d'un lot alors que le lot témoin présentait 8,5 % de pourriture (189).

Des essais effectués par l'Institut français de Recherches fruitières d'Outre-mer ont montré que l'enrobage des fruits avec les rouleaux d'un convoyeur, d'une formule paraffinique de consistance pâteuse renfermant 4 à 6 ppm de thiabendazole, soit 4 à 6 g par tonne de fruits traités, assure une bonne efficacité, même lorsque l'inoculation se produit après le traitement (48).

1.1.4. LES EMBALLAGES -

Ce procédé est le plus utilisé pour le biphenyle : soit sous forme de papier individuel pour une partie des fruits, soit sous forme de feuilles de papier Kraft capitonnant les cagettes d'oranges, soit sous forme de cagettes imprégnées. C'est TOMKINS qui eut l'idée d'imprégner des papiers de solutions antifongiques : il fit des expériences avec des papiers iodés, et finalement avec un papier imprégné de diphényle ou d'ortho-phényl-phénol (215^{bis}).

Depuis 1942, le papier "Crown" au diphényle sert, aux U.S.A., à emballer les agrumes ; cet usage s'est répandu au Brésil, au Liban, en Afrique du Sud (17). Israël l'a rendu obligatoire pour les fruits destinés à l'exportation (53).

On utilise, en général, un mélange paraffine - diphényle (1 : 1) dont on imprègne le papier à raison de 30 g par kilo et le carton à raison de 100 g par kilo (79).

L'avantage de ces emballages traités est que les fruits soustraits à leur conditionnement perdent très vite le peu de diphényle qu'ils ont absorbé et ne voient pas leurs propriétés organoleptiques modifiées au moment de la consommation.

D'autres produits sont utilisés dans d'autres domaines, ou sont actuellement à l'étude :

- le DBTCE ou dibromo-tétra-chloroéthane, qui semblait intéressant à cause de son activité sur les souches résistantes au diphényle, semble bien abandonné (17, 107) ;
- le 2-4-D et son ester isopropylique, autorisé pour les citrons aux U.S.A. On utilise une solution à 500 ppm, mais il faut conserver les fruits à température inférieure à 10 - 20°C (125, 187) ;
- la butylamine secondaire, admise aux U.S.A. à la dose de 30 mg/kg dans ou sur les agrumes traités après la récolte (9 bis) ;
- les esters trichlorométhyliques d'acides alkylthiosulfoniques qui semblent très actifs et sont encore à l'étude. Pour les agrumes, les meilleurs sont l'éthanethiosulfonate d'éthyle ou de butyle (25) ;
- l'isopropyl N-phényl-carbamate (300 ppm) associé à l'O-phényl-phénate de sodium (1 %), sur lequel on peut avoir des doutes puisque, avant traitement, les fruits doivent être lavés par une solution d'hypochlorite (206) ;
- le méthyl-thiophanate dont l'activité correspond à celle du thiabendazole mais à dose plus élevée (5 mg/kg), et qui a pour métabolite le MBC comme le bénomyl. C'est un produit endothérapie (113, 224, 59).

1.2... TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES -

Très utilisés en élevage, on les essaye maintenant en agriculture. L'érythromycine et la tylosine sont les plus efficaces contre les maladies d'agrumes.

La carbomycine et les tétracyclines sont inhibiteurs, mais à une concentration plus élevée que celle de l'érythromycine et de la tylosine. Ces deux derniers antibiotiques ont une activité proche de celle du thiabendazole.

1.3... TRAITEMENT MECANIQUE -

C'est l'objet d'un brevet américain (54). Les fruits frais et les légumes sont recouverts de polymères hydrophiles qui permettent une réduction de la transmission des vapeurs d'eau et les échanges gazeux (un peu comme les enduits cireux). Deux sortes de polymères sont essayés :

- polymères insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques, constitués par polymérisation de monohydroxy-alkyl (ou alcoxy-alkyl) - acrylate ou métacrylate ;
- polymères solubles dans l'eau, constitués par polymérisation d'hydroxy-alkyl-acrylate ou métacrylate.

L'application se fait par solution ou formation in situ du polymère.

La protection des fruits est assurée contre les spores des champignons causant la pourriture et aussi contre les attaques par les insectes (54).

1.4... TRAITEMENT PHYSIQUE -

L'irradiation des fruits par le $^{60}\text{Co}^*$ a été étudiée in vitro et in vivo sur *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora parasitica* et *Geotrichum candidum*.

L'activité de ces rayons dépend de la dose utilisée. Les doses applicables sont de l'ordre de 100 à 200 Krad. Au-delà, les fruits subissent des modifications organoleptiques et une diminution considérable de la teneur en vitamine C. Les rayonnements agissent sur la germination des spores et leur croissance (118).

Etant donné la proximité des doses actives et toxiques pour le fruit, il a été essayé une combinaison entre l'irradiation par le $^{60}\text{Co}^*$ et un trempage dans une solution de diphényle. Les essais réalisés sur de nombreuses souches ont montré que l'action sur certaines était augmentée avec une réduction de doses de 20 à 5 mg de diphényle et de 140 à 60 Krad, tandis que sur d'autres elle demeurerait inchangée (18).

1.5... TRAITEMENT AVANT RECOLTE -

Ce dernier procédé correspond, en fait, à une modification dans la technique d'utilisation des fongicides usuels.

Le bénomyl appliqué avant la récolte à une concentration de 100 à 1000 ppm donne d'excellents résultats contre les trois agents pathogènes : *Diplodia natalensis*, *Phomopsis citri*, *Penicillium digitatum*. Les vapeurs sont appliquées une à cinq semaines avant la récolte (82).

Une autre étude a montré qu'un traitement au bénomyl à 100 ppm sur les variétés d'oranges *Shamouti* et *Valencia* a été efficace contre la pourriture verte, même sur les fruits contaminés, 130 jours après le traitement. Dans les mêmes conditions, le thiabendazole et le fubéri-dazole furent inefficaces (81).

Pour les producteurs, ce système présente l'avantage de supprimer les installations nécessaires (locaux et matériels) pour le trempage ou la pulvérisation des fruits. Les fruits ainsi récoltés sont prêts à l'expédition.

2. PROBLÈMES SOULEVÉS

PAR L'EMPLOI DES ANTIFONGIQUES

Le problème des résidus n'est certes pas le seul que soulève l'emploi des fongicides. D'autres problèmes ont été évoqués et ont fait l'objet de nombreuses études.

Malgré certains inconvénients, ces fongicides présentent de grands avantages économiques.

2.1... LES AVANTAGES -

2.1.1. LES ANTIFONGIQUES SE FIXENT ESSENTIELLEMENT SUR L'ECORCE DES AGRUMES (40, 183, 173, 150, 112) où ils sont localisés tout particulièrement dans les poches à essence du flavedo, tandis que l'albedo et la pulpe (la partie comestible du fruit) contiennent des quantités insignifiantes (173).

Les études ont montré que la rupture des poches à essence, suivie d'un rinçage à l'eau, du séchage ou de la cuisson des écorces, a entraîné l'élimination de 92,2 à 100 % de biphényle (173, 173 bis).

Des études faites sur des fruits traités par le bénomyl et le thiabendazole ont montré que la plus grande concentration se trouve dans l'écorce. Ces mêmes fruits ont été entreposés à -1°C ; au bout de 5 mois, aucune trace de bénomyl ou de thiabendazole n'a pu être mise en évidence dans la pulpe (21).

Les résidus de thiabendazole dans les agrumes ont pu être déterminés en marquant du thiabendazole utilisé en solution de trempage à 1 o/oo : après 4 semaines, l'écorce

renferme 4 µg de thiabendazole par gramme, l'albedo ne renferme que 8 à 12 % seulement ; aucune trace de thiabendazole n'a pu être détectée dans la partie comestible (183).

2.1.2. LES ANTIFONGIQUES REDUISENT LES PERTES EN FRUITS -

Les pertes dues aux divers champignons peuvent, si les fruits ne sont pas protégés, atteindre 30 à 80 % des fruits transportés (46, 47).

Les champignons susceptibles de s'attaquer aux agrumes sont nombreux, mais les plus grandes pertes sont causées surtout par les pourritures à *Penicillium* dues à la moisissure verte (*Penicillium digitatum*) et à la moisissure bleue (*Penicillium italicum*), par les pourritures de la région pédonculaire dues aux diverses espèces, notamment *Diplodia natalensis*, *Phomopsis citri*, *Alternaria citri*, et par la pourriture brune due aux diverses espèces de *Phytophthora* (112, 173).

Ces champignons s'attaquent généralement aux fruits lésés au cours de la cueillette ou au cours des nombreuses manipulations auxquelles sont soumis les agrumes entre la récolte et la consommation.

La maladie se propage par les spores, de sorte qu'un fruit pourri capable d'en émettre des milliards peut contaminer un très grand nombre d'autres fruits sains (112). En plus, les émanations provenant des fruits envahis par le *Penicillium digitatum* riche en éthylène se propagent dans les dépôts, accélèrent le vieillissement des fruits, les rendent plus sensibles aux maladies et diminuent ainsi leur valeur.

Pour toutes ces raisons économiques et diététiques, l'utilisation des fongicides constitue une nécessité. C'est ainsi qu'un enduit cireux de biphényle sur des

citrons fait passer la perte des fruits de 40 %, pour un entreposage de 2 à 3 mois, à 7 % seulement, pour un entreposage plus prolongé, de 3 à 4 mois (173).

Le bénomyl, appliqué à la concentration de 0,5 à 1 o/oo, réduit les pourritures sur les oranges et les pamplemousses et augmente ainsi la durée de l'entreposage (29, 30, 64, 81, 127, 197).

Le thiabendazole, incorporé à la concentration de 1500 à 4500 ppm dans une émulsion de cire, diminue les pourritures sur les oranges jusqu'à 1,1 % après 40 jours d'entreposage à 60°C, tandis que le taux de pourritures sur les fruits non traités atteint 20,55 % (101, 181).

De même, le thiabendazole appliqué à la concentration de 2,5 à 5 ppm retarde la croissance de *Diplodia natalensis*, *Phomopsis citri* et *Penicillium digitatum* (63).

Des études ont montré que l'application du thiabendazole est plus efficace avant le déverdissement des agrumes qu'après (196).

De même, une bonne conservation des fruits jusqu'à 70 jours sans apparition de nécrose est assurée par un enrobage cireux contenant jusqu'à 4,5 % d'orthophénylphénate de sodium pour les oranges *Valencia* et 2,1 % pour les pamplemousses et les oranges *Shamouti* (175).

L'activité des antifongiques utilisés sur les agrumes contre les maladies de conservation peut être classée de la façon suivante, aux doses usuelles d'utilisation :

- bénomyl 0,005 % > 2-aminobutane phosphate à 1 % > thiabendazole 0,1 % > eau chaude à 53°C (5 minutes) > O-phénylphénol 2 % contenant de l'hexamine à 1 %.

(82, 83, 86, 100, 101, 194, 195).

D'autres études ont montré que le thiabendazole est plus efficace que le bénomyl contre les incidences du gel sur le pamplemousse (188).

Par contre, ces deux fongicides ont une activité égale vis-à-vis de *Penicillium italicum* et *vegetatum* quand il s'agit d'une infection naturelle (31, 101).

Des associations de deux ou plusieurs fongicides sont encore plus efficaces (106). C'est ainsi qu'une solution contenant 0,01 % de thiabendazole et 0,5 % d'ortho-phényl-phénate de sodium est très efficace pour le traitement des mandarines et des oranges artificiellement inoculées par *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (207).

De même, une association de 1 % d'ortho-phényl-phénate de sodium et 300 ppm d'iso-propyl-phényl carbamate est efficace contre les attaques de *Penicillium* sans affecter la qualité du fruit, ni la composition du jus (206).

Toutes ces études nous donnent une idée de l'importance des maladies cryptogamiques et de la nécessité qui s'impose de lutter contre elles par les moyens que nous offre la technique moderne, et en particulier l'emploi des fongicides, si l'on veut conserver à l'humanité la plus grande part de ses ressources agricoles.

2.2... LES INCONVENIENTS -

2.2.1. L'ODEUR -

Le biphényle présente une odeur désagréable perceptible à la surface des fruits fraîchement sortis des emballages (173), mais elle disparaît assez rapidement par aération des fruits soumis à une bonne ventilation (173).

Mais il n'y a pas de rapport direct entre la concentration en biphényle et l'odeur perçue (201).

D'autres produits fongicides ont eux aussi une certaine odeur, comme le bénomyl et l'O-phényl-phénol.

2.2.2. LA PHYTOTOXICITE -

L'étude de la phytotoxicité d'un fongicide (et d'un pesticide en général) est très importante et constitue l'objet de nombreuses recherches (un fongicide totalement dépourvu de phytotoxicité est particulièrement recherché).

L'O-phényl-phénol s'est avéré phytotoxique. En effet, à trop forte concentration, il provoque l'apparition de taches rouges sur les fruits (207).

Les cires à l'O-phényl-phénol, par exemple, se déposent irrégulièrement sur les fruits et, au niveau des concentrations maximales en cire, provoquent de gros dégâts (175).

Mais, en revanche, les études qui ont porté sur le thiabendazole ont montré que celui-ci ne provoquait ni vieillissement, ni piquage, ni entachage des fruits (196).

De même, le bénomyl ne provoque ni brûlure, ni effet toxique (194).

Au niveau du consommateur, les taux résiduels des fongicides restent faibles car ils sont éliminés soit par métabolisme ou par dégradation, soit par volatilisation (cas du biphényle et de l'O-phényl-phénol) (173, 201), soit par lavage avec des détergents (cas du thiabendazole) (154).

2.2.3. L'APPARITION DES SOUCHES RESISTANTES constitue un problème à considérer avec attention.

Etudions tout d'abord le mécanisme de la résistance avant d'envisager quelques cas.

L'apparition des souches résistantes peut être due à trois causes essentielles :

- à une sélection obtenue dans une population hétérogène.
Dans cette population, certaines souches sont plus sensibles au toxique que d'autres, pour une dose donnée.

Si on met en oeuvre une dose qui ne tue que les éléments les plus sensibles, on sélectionnera les éléments les plus résistants qui seront les seuls à pouvoir survivre tant que la pression de sélection se maintiendra. On obtiendra ainsi une population plus résistante au fongicide que la population initiale .

En l'absence de toxique, si la population est hétérozygote, la souche sensible a toute chance de réapparaître ; si la population sélectionnée devient homozygote, la résistance peut alors être un caractère acquis (115) ;

- à des mutations.

Certains fongicides, pour des doses déterminées, peuvent agir sur les chromosomes, sur les gènes, et provoquer des races nouvelles, des mutants. Une mutation peut ainsi entraîner l'apparition d'une souche plus résistante que la souche initiale ;

- à des adaptations du champignon au toxique.

Ceci peut être le fait d'un processus de détoxification du composé par le cryptogame. Ce phénomène de détoxification est en général dû à l'intervention d'enzymes (115).

Le problème de la résistance et son mécanisme mettent en jeu d'autres facteurs, et certainement des facteurs différents pour chaque cas de résistance provoquée ou observée.

Envisageons maintenant quelques cas de résistance observés durant l'utilisation des quatre fongicides qui nous intéressent spécialement dans ce travail.

Pour certaines concentrations de thiabendazole, on a noté l'apparition de souches de *Penicillium digitatum* et de *Penicillium italicum*, résistantes à ce fongicide, de telle sorte qu'un traitement avec 3000 ppm de thiabendazole en suspension dans l'eau n'a plus aucun effet sur ces champignons.

D'autres études ont montré que *Penicillium italicum* est résistant in vitro au thiabendazole, bénomyl, méthylthiophanate et au carbendazime. L'application du thiabendazole et du bénomyl sur des oranges *Valencia*, inoculées expérimentalement par la souche résistante, ne diminue pas le développement des moisissures bleues. Mais, par contre, on n'a pas noté de résistance vis-à-vis des moisissures vertes (*Penicillium digitatum*) (148).

Une résistance croisée a été notée entre le méthylthiophanate et le bénomyl vis-à-vis des souches de *Penicillium digitatum* et de *Penicillium italicum* (109).

La résistance des souches de *Pythium paroecandrum* à l'action du BCM semble due à une non-fixation du BCM par les cellules du mycélium (76).

Depuis quelques années, on a noté aux U.S.A. l'apparition de souches de *Penicillium* (*digitatum* et *italicum*) résistantes au biphényle. L'apparition de ces espèces résistantes se fait à partir des souches sensibles au biphényle et soumises à des concentrations subléthales d'O-phénylphénate de sodium ou par l'exposition continue au biphényle. Les moisissures se développent d'autant plus rapidement que les cartons ne sont pas ventilés (89) ; elles présentent des mycéliums colorés en rouge ou en blanc au lieu de bleu ou vert (88).

2.2.4. UN AUTRE EFFET NON INTENTIONNEL DES TRAITEMENTS FONGICIDES A PU ETRE OBSERVE : c'est ainsi que les fongicides peuvent provoquer sur certaines plantes des désordres physiologiques tels que celles-ci présentent vis-à-vis des maladies cryptogamiques, des insectes ou des acariens, une réceptivité tout à fait différente de celle des plantes non traitées.

Certains traitements antifongiques, en effet, provoquent un développement anormal de diverses maladies cryptogamiques et une pullulation importante d'arthropodes. Le mécanisme de cet effet est encore mal connu (115).

2.2.5. L'EVENAIL DES SOUCHES SUR LESQUELLES LES FONGICIDES SONT ACTIFS est assez limité (23, 112, 119).

En effet, le thiabendazole appliqué par trempage des fruits dans des bains à 0,1 % est actif contre *Penicillium italicum* et *Penicillium digitatum*, assez actif contre *Diplodia natalensis* et *Phomopsis citri*, mais inefficace contre *Oospora citri aurantii* et *Phytophthora citrophthora*. (112).

Le bénomyl appliqué à une concentration de 0,001-200 µg/ml inhibe la germination de six espèces de champignons, mais, par contre, il est sans effet ou stimule la germination des autres (119).

2.2.6. L'INFLUENCE DE TRAITEMENTS DIVERS -

C'est le cas du déverdisage. Les agrumes sont en effet cueillis encore verts, puis déverdis le plus souvent par l'éthylène. Les fongicides appliqués avant le déverdisage sont plus efficaces que s'ils sont appliqués après (196).

D'autres études ont montré que le thiabendazole, le 2-aminobutane phosphate, le biphényle et le bénomyl, sont efficaces pour la conservation des fruits, déverdis ou non,

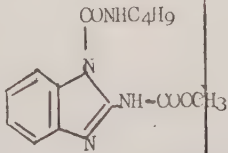
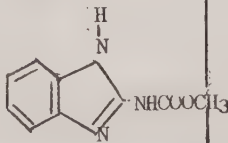
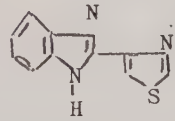
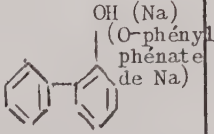
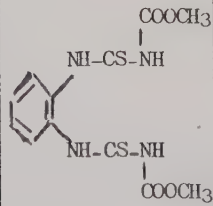
durant l'entreposage, mais le traitement par l'éthylène augmente l'incidence des moisissures (126), ce qui va à l'inverse du but recherché.

Quoi qu'il en soit, les problèmes soulevés par les traitements fongicides méritent d'être examinés avec la plus grande attention. Les effets déjà cités revêtent un caractère scientifique extrêmement intéressant et sont loin d'être dénués d'intérêt pratique.

3. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Les propriétés les plus importantes ont été rassemblées dans le tableau I.

TABLEAU 1 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES
DES FONGICIDES ETUDIES

PRODUIT	FORMULE DEVELOPPE	FORMULE BRUTE	NOM CHIMIQUE	POIDS MOLECULAIRE	ASPECT
BENOMYL (Benlate) (98, 124, 213)		$C_{14}H_{18}N_4O_3$	ester méthylique de l'acide 1(butyl-carbamoyl) 2-benzimidazole carbamique	290	cristaux blancs
BCM (Carbendazime) (168)		$C_9H_9N_3O_2$	benzimidazole carbamate de méthyle	191	poudre gris clair
THIABENDAZOLE (98, 110, 205)		$C_{10}H_7N_3S$	2-(4'-thiazolyl) benzimidazole	201	poudre blanche
BIPHENYLE (173, 205, 230)		$C_6H_5 - C_6H_5$	biphényle ou diphényle	154	lamelles brillantes incolores
O-PHENYL-PHENOL (205)		$C_{12}H_{10}O$		170	poudre blanche
THIOPHANATE DE METHYLE ou METHYL- THIOPHANATE (59, 113)		$C_{12}H_{14}O_4N_4S_2$	1,2bis(3-méthoxy- carbonyl- 2-thioureido) benzène	342	corps cristallisé

POINT DE FUSION	SOLUBILITE			ODEUR	VOLATILITE
	Eau	Huiles	Solvants organiques		
	—	—	CHCl ₃ : 9 g/100 g moins soluble dans les autres	faible odeur âcre	non volatil à la température ordinaire
307 à 312°C	à pH 6 : 8 mg/l à pH 4 : 28 mg/l		hexane : 0,5 ppm benzène : 36 ppm dichloro- méthane : 68 ppm éthanol : 300 ppm		
304 - 305°C (point de subli- mation : 250°C)	pH 3 à 5 : 0,25 mg/ml pH 2 : 10 mg/ml		sol. dans diméthyl-sulfoxyde diméthyl-acétamide diméthyl-formamide légèrement solv. dans alcool, esters, chlorures d'hydro- carbures		
70 - 71°C (point d'ébul- lition : 254°C)	0,8 mg/l	+	+	++	volatil et entraînable par la vapeur d'eau
56 - 57°C				++	
181,5° - 182,5°C	peu soluble dans l'eau			—	

4. MÉCANISME D'ACTION DES FONGICIDES

Tous les produits que nous étudions, sous le nom de fongicides, sont en réalité des fongistats (81, 173, 202).

Le mode d'action des fongicides se décompose en un certain nombre d'étapes dont les plus importantes sont :

- la mise en contact du fongicide et du champignon ;
- les effets du fongicide sur le champignon.

4.1... MISE EN CONTACT DU FONGICIDE ET DU CHAMPIGNON -

Si le fongicide est chimiothérapique, il doit être soluble dans les constituants végétaux, notamment la sève.

Si, au contraire, le fongicide reste sur la surface du végétal traité sous la forme de corpuscules de quelques microns de diamètre, plusieurs hypothèses peuvent expliquer son mode d'action :

- Première hypothèse : il y a transport de la matière toxique vers l'inoculum.
- Deuxième hypothèse : l'inoculum, en germant, rencontrera une fraction de fongicide.

4.2... EFFETS DU FONGICIDE SUR LE CHAMPIGNON -

Trois principaux effets :

4.2.1. LES EFFETS MORPHOLOGIQUES -

L'action du fongicide est à double tranchant, allant de la destruction de la moisissure jusqu'à la détermination de phénomènes de résistance.

Il y a surtout modification du mycélium. Celui-ci, sous l'influence du toxique, se développe imparfaitement et

des malformations apparaissent. Ces malformations ont été décrites chez les genres *Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium* ... à la suite de l'action des phénols.

L'action des fongicides peut également entraîner la stérilité de certaines espèces : comme *Monilia fructicola*, par exemple, en supprimant leur sporulation.

D'après plusieurs auteurs, et notamment FLEMING et al. (1950), le groupe-SH est nécessaire pour assurer la division des cellules, et notamment les cellules germinatives. Tout produit réagissant sur ce groupe entraînerait l'arrêt des divisions nucléaires et ainsi la stérilité (115).

4.2.2. LES EFFETS CYTOLOGIQUES -

Certains fongicides agissent sur les mitoses des noyaux des cellules végétatives ou germinatives :

- soit par action directe sur la chromatine, causant des déformations chromosomiques graves ;
- soit, le faisceau ne se forme pas et la cellule ne peut se diviser et devient apparemment polyploïde ;
- soit, le chromosome ne subit pas d'altération majeure et seuls certains gènes sont atteints, ce qui provoque des mutations offrant parfois une résistance anormale au toxique ayant déterminé le phénomène. (115).

Parmi les fongicides à action anti-mitotique, on peut citer l'actidione, les organo-mercuriels, certains carbamates et certaines quinones.

4.2.3. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES -

Les fongicides peuvent agir sur les réactions vitales des champignons, principalement au niveau des métabolites et des enzymes :

- au niveau des métabolites, le fongicide empêche le champignon d'utiliser le glucose, ou bien il peut prendre

la place d'un métabolite naturel et interrompre la réaction. Dans ce cas, le fongicide est appelé anti-métabolite ;

- au niveau des enzymes : exemple : action des quinones et des hydroquinones sur l'amylase pancréatique, l'amylase de malt, la catalase. En revanche, certains enzymes peuvent agir sur la molécule d'un composé et accroître sa toxicité.

Sur le mode d'action du biphényle, des études ont montré que celui-ci rendait non assimilables les facteurs de croissance de la moisissure (97).

Il est généralement admis que le biphényle agit à l'état gazeux en inhibant la germination des spores, retardant la croissance du mycélium et prévenant la formation de nouvelles spores (69, 177).

Par contre, pour d'autres auteurs, c'est un fongistat : il inhibe la croissance du mycélium, mais non la germination des spores qui reprennent après la suppression de l'action du biphényle (96).

4.3... MODE D'ACTION DU THIABENDAZOLE -

Les recherches effectuées par STARON et ses collaborateurs ont montré que l'action du thiabendazole sur les champignons s'exerce :

- au niveau des transaminations. Cette inhibition peut être levée partiellement par la pyridoxine et la biotine, dont les effets se traduisent, au niveau du mycélium, par une augmentation des acides aminés libres ;
- au niveau de la biosynthèse des protéines. Le thiabendazole semble se fixer sur une structure effectuant la diataxie des acides aminés, pour la synthèse des peptides. Cette inhibition est très faiblement levée par la guanine et l'acide paraaminobenzoïque, mais les protéines alors synthétisées diffèrent dans leur composition des protéines originelles.

5. RAPPORT STRUCTURE - ACTIVITÉ

Les fongicides de synthèse prenant à l'heure actuelle une importance grandissante, d'importantes études ont été consacrées, tendant à augmenter leur activité par une modification, parfois minime, de leur formule.

Et, sans entrer dans le détail des techniques expérimentales, nous donnons ici un aperçu des résultats auxquels ces recherches ont abouti :

- une substitution en para plutôt qu'en ortho ou méta,
- un ammonium quaternaire,
- un chlorophénol,
- deux à trois groupements à chaîne aliphatique courte,
- un ou deux groupements à poids moléculaire élevé (121),
- un maximum d'insaturation (79),

augmentent l'activité fongicide dans des proportions considérables qui peuvent parfois varier du simple au double.

Ont un pouvoir fongicide :

- Les hydrocarbures insaturés : avec un maximum d'insaturation, ils agissent en abaissant les échanges en oxygène.

Dans ce groupe, on trouve surtout :

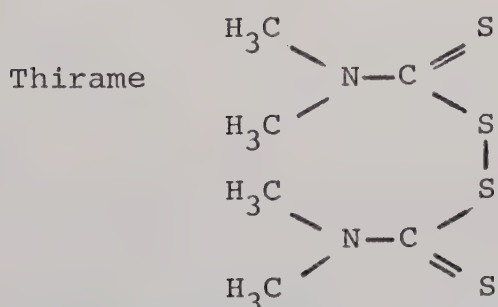
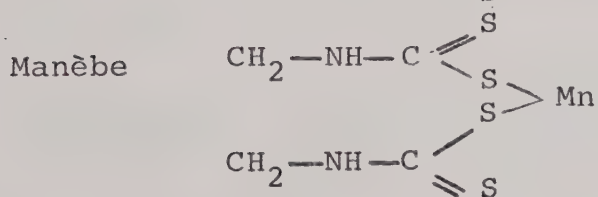
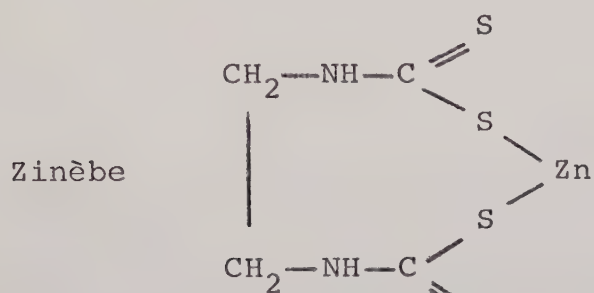
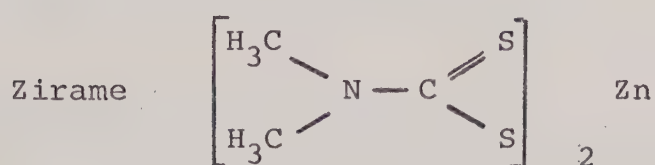
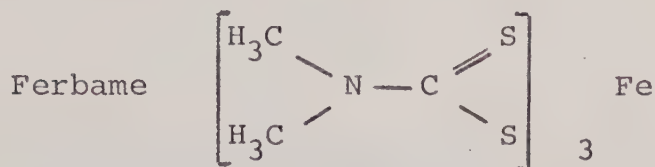
- . le biphényle qui a été largement employé et qui reste toujours un fongicide essentiel des agrumes ;
- . son dérivé hydroxylé : l'orthophényl-phénol.

Leurs dérivés nitrés aromatiques sont tous fongicides, mais inemployés du fait de leur toxicité.

- Dérivés de l'acide dithiocarbamique :

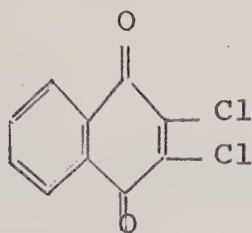


De nombreux dérivés ont été commercialisés comme :

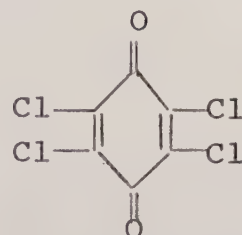


Produits très utilisés actuellement, surtout le zinèbe qui agit contre le mildiou de la vigne et des pommes de terre, et contre le black_rot (157).

- Quinones et leurs dérivés halogénés et alkylés : (très actifs, non toxiques, peu phytotoxiques). Citons, à titre d'exemple, le dichlone et le chloranil.



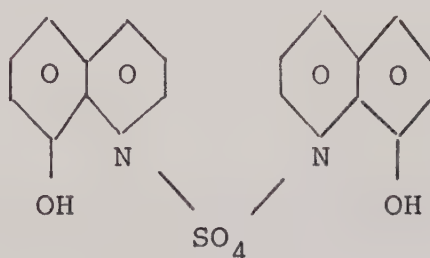
Le dichlone utilisé pour désinfecter les semences et contre la tavelure des pommes



Chloranil

- Dérivés des quinoléines :

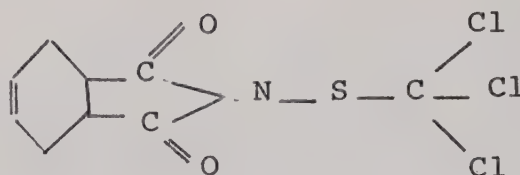
Sunoxol : sulfate neutre d'orthoxyquinoléine,



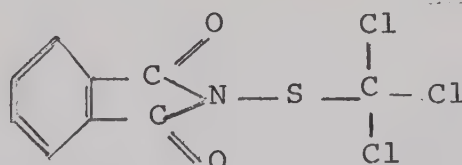
qui a comme avantage d'être fongicide et bactéricide en même temps.

- Phthalimides : (très polyvalents et très actifs) :

Captane

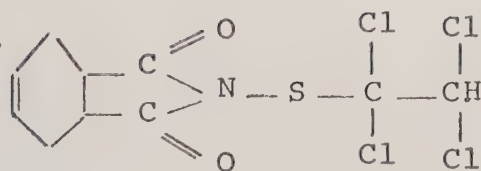


Phaltane (Folpet)



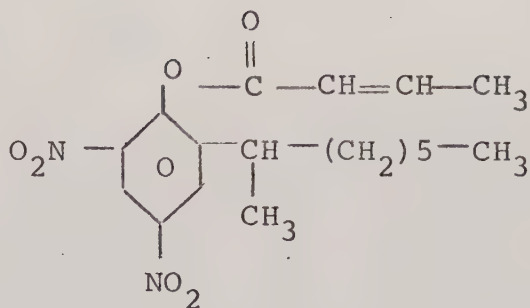
plus phytotoxique que le premier.

Captafol



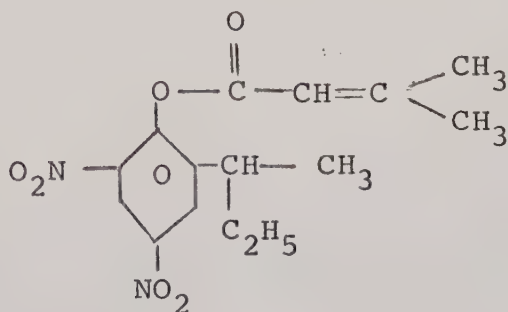
- Dérivés des crotonates :

Dinocap



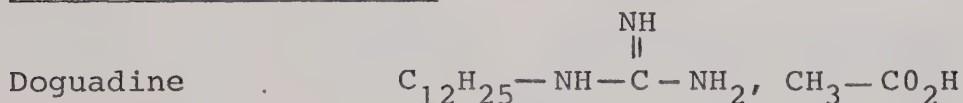
utilisé contre l'oïdium des arbres fruitiers et de la vigne.

Binapacryl



Ces deux dérivés ont l'inconvénient d'être irritants.

- Dérivé de la guanidine :



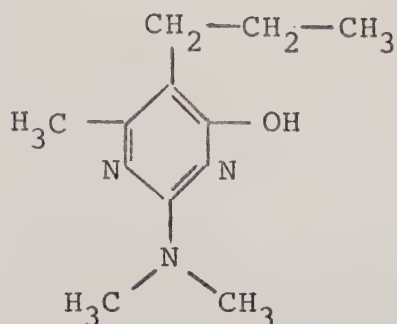
très actif (mais coûteux), à action curative et préventive.

- Les esters de l'acide thiosulfonique : sur 13 espèces de champignons, les esters trichlorométhyliques ont une activité supérieure aux esters méthyliques (25).

Ils ont une haute activité, une faible toxicité pour les mammifères, mais sont peu stables et ont une odeur désagréable.

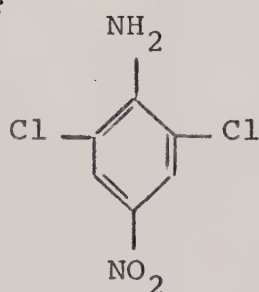
- Dérivé de la pyrimidine :

Méthirimol



- Dérivé de l'aniline :

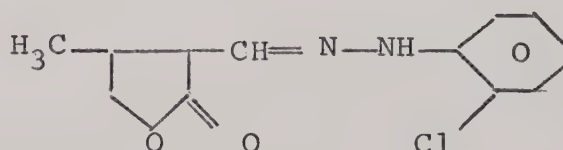
Dichloran



non toxique - tab. C.

- Dérivé d'isoxazole :

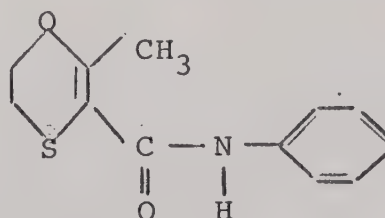
Drazoxolon



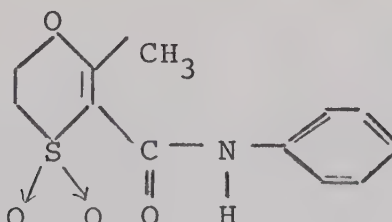
insoluble dans l'eau et peu toxique.

- Dérivés de l'oxathiinne : (à activité systémique) :

Carboxine



Oxycarboxine



- Les hétérocycles comme les benzimidazoles : parmi eux, on trouve :

- . le bénomyl, le plus actif ;
- . son métabolite, le BCM : le benzimidazole carbamate de méthyle ;
- . le thiabendazole ;
- . le fubéridazole (actuellement à l'étude) ;
- . le thiophanate et le méthyl-thiophanate.

Le bénomyl, le thiabendazole et le fubéridazole, à la concentration de 0,5 ppm, inhibent la croissance de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Collectotrichum gloeosporioides* et *Diplodia natalensis*. Le bénomyl est le plus actif des trois (82).

6. TRANSFORMATION BIOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE

6.1... METABOLISME -

Les fongicides constituent un groupe hétérogène et il est difficile de leur trouver un métabolisme commun. Mais comme la plupart des fongicides qui nous intéressent ici présentent des cycles aromatiques, ceux-ci sont d'abord hydroxylés, puis transformés en glucuronides, en dérivés sulfoconjugués, ou encore en esters de l'acide mercapturique (161).

De même, le métabolisme des fongicides au sein des plantes a été largement étudié (38).

6.1.1. METABOLISME DU BENOMYL ET DU BCM -

- Au sein des plantes :

Le produit essentiel de la transformation du benomyl et du méthylthiophanate dans les plantes est le BCM (72) : composé assez stable qui peut cependant se décomposer en 2-aminobenzimidazole et benzimidazole (224).

D'autres dérivés ont également été mis en évidence : l'0-aminobenzonitrile, l'aniline et les conjugués bêta-glycosidiques du BCM et du 2-aminobenzimidazole (184).

Après traitement des plantes par le benomyl, le BCM et le méthyl-thiophanate, le taux de disparition du BCM est relativement lent, bien que le 2-aminobenzimidazole soit détecté, mais jamais à un taux dépassant 5 % de celui de BCM (22).

- Métabolisme chez les animaux :

L'administration du benomyl aux souris, rats et moutons, permet d'identifier deux métabolites formés par hydroxylation et deux métabolites formés par hydrolyse de la fonction ester.

Les métabolites d'hydroxylation sont excrétés sous forme de dérivés sulfo-et glucuro-conjugués (58).

D'autres études ont montré que plus de 99 % de la dose orale unique (7,7 et 30,8 mg resp.) administrée à des rats et des chiens est éliminée dans les urines et les fèces au bout de 72 heures, le métabolite le plus important étant le méthyl-5-hydroxy-2-benzimidazole carbamate sous forme de dérivé sulfo-et 3-glucuro conjugués (74).

Ces métabolites conjugués sont donc vite éliminés (229). Des auteurs ont pu isoler in vitro le 2-amino-5-hydroxy-benzimidazole ainsi que le 2-amino-1-butyl-carbamoyl-benzimidazole, après incubation d'extraits de foie de souris. Ces métabolites n'ont pas été trouvés in vivo (229).

Le bénomyl est également métabolisé et éliminé de la même manière dans le lait de vaches ou les oeufs de poules nourries avec des aliments contenant des résidus de bénomyl. Mais il faut une dose particulièrement élevée, de 25 à 50 ppm, pour retrouver un maximum de 0,1 ppm (74).

Des métabolites mineurs, comme le méthyl-2-benzimidazole carbamate et le méthyl-4-hydroxy-2-benzimidazole carbamate, ont pu aussi être isolés des urines (74) (fig. 1, 2, 3).

6.1.2. METABOLISME DU THIABENDAZOLE -

- Au sein des plantes :

Les études faites sur la disparition du thiabendazole au sein des plantes montrent qu'en 10 jours, 75 % de la dose initiale (20 mg/kg) disparaissent (3).

D'autre part, d'autres études ont montré que le thiabendazole, appliqué sur des oranges *Valencia*, reste intact après 4 semaines de stockage (183).

Donc, le thiabendazole est un produit assez stable, ce qui fait qu'il garde longtemps son activité antifongique ; mais cet avantage constitue un danger pour l'homme au moment de la consommation.

- Métabolisme chez l'homme et les animaux :

Comme le thiabendazole était utilisé au début de sa découverte comme anthelminthique, plusieurs études ont été faites sur son métabolisme chez l'homme et les animaux.

Ces études ont montré que le thiabendazole, marqué au ^{14}C et administré par voie orale chez l'homme à une dose de 1 g, disparaît complètement du plasma en 24 à 48 heures. Ceci est dû à une excrétion dans les urines et les fécès : 1 % de la dose est excrété sous forme de thiabendazole libre ou de son métabolite, le 5-hydroxy-thiabendazole non conjugué, mais la quasi totalité de la dose injectée est excrétée dans l'urine et les fécès sous forme de dérivés glucuro ou sulfoconjugués du 5-hydroxy-thiabendazole.

Chez les animaux de laboratoire, rats et chiens, on retrouve dans les urines les mêmes métabolites que chez l'homme, mais à des taux différents (215).

Chez les ruminants, après ingestion d'une certaine dose de thiabendazole marqué au ^{14}C , au bout de 24 heures : 65 à 75 % de la radioactivité sont trouvés dans les urines, 15 à 25 % dans les fécès, 0,1 à 1 % dans le lait sous forme de 5-hydroxy-thiabendazole libre et conjugué (90).

6.1.3. METABOLISME DU BIPHENYLE ET DE L'O-PHENYL-PHENOL -

- Au sein des plantes :

Aucune transformation n'a été signalée.

- Chez les animaux :

Des lapins ont reçu du biphenyle et de l'O-phényl-phénol par voie intraveineuse, un jour sur deux ou un jour sur trois, à raison de 10 mg par kg de poids.

18 mois plus tard, on a identifié dans les urines des lapins les métabolites suivants (métabolites du biphényle) :

diphényl-4, ol
diphényl-4, 4', diol
diphényl-3, 4, diol
diphényl-2, ol.

Ces dérivés ont été identifiés avec certitude et excrétés sous forme de conjugués sulfuriques ou glucuroniques.

On trouve aussi des dérivés dihydro-hydroxy, dihydro-dihydroxy, et l'acide phényl-mercapturique (6).

D'autres études effectuées sur les rats et les souris ont permis de retrouver les mêmes métabolites (12, 65).

Des analyses chromatographiques plus fines ont permis de mettre en évidence des dérivés méthoxylés en 3 ou 4 chez le rat (168, 172).

Chez le lapin, après une prise orale de 1 g de biphényle en 4 jours, 64 % de cette dose ont été retrouvés dans l'urine sous forme de 4-OH-diphényle, de dérivés sulfo- et glucuroconjugués (65, 225).

D'après les travaux de CATELANI et ses collaborateurs, l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phényl-hexa-2,4-diène est le résultat du métaclivage du 2,3-dihydroxy-biphényle par *Pseudomonas putida*. Ces composés sont les intermédiaires de la transformation du biphényle en acide benzoïque (39).

Des études récentes ont montré que 29,5 % de la dose administrée à des rats ont été retrouvés dans les urines au bout de 96 heures, sous forme de dérivés mono, di et trihydroxy-biphényle. Ces dérivés sont :

le 4-hydroxy-biphényle..... (7,7 %)
le 4,4'-dihydroxy-biphényle..... (11,4 %-
le 3,4, 4'-trihydroxy-biphényle en quantité non dosable.

D'autres métabolites en plus faible quantité ont été signalés :

3,4'-dihydroxy 4-méthoxy-biphényle et le 4,4'-dihydroxy 3-méthoxy-biphényle.

Les expériences ont montré que le biphényle est hydroxylé et conjugué avant son apparition dans la bile (143).

6.2... DEGRADATION PHYSICO-CHIMIQUE -

6.2.1. DEGRADATION DU BENOMYL ET DU BCM -

Le bénomyl et le méthyl-thiophanate se décomposent en solution aqueuse en méthyl-benzimidazole-2-yl carbamate (3, 35, 73, 103, 184, 227).

Des études plus poussées ont expliqué le mécanisme d'hydrolyse du bénomyl en BCM et l'importance du pH (33, 36).

En milieu acide, le bénomyl est hydrolysé en BCM, par contre, en milieu alcalin, le bénomyl est cyclisé en 3-butyl-2,4-dioxo (1,2-a)-S-triazinobenzimidazole (STB). Le STB, à son tour, est hydrolysé en 1-(2-benzimidazolyl)-3-butylurée (BBU) en milieu fortement alcalin (pH >13,5) (34).

- Influence de la lumière :

La transformation du méthyl-thiophanate en BCM sous lumière UV a été étudiée par BUCHNAUER et al. (32).

Le BCM lui-même, en suspension méthanolique, exposé aux rayons UV, se décompose en mono et di-(méthoxy-carbonyl) guanidines, diméthyl oxalate et peut-être en acide guanidique et ses sels (227).

6.2.2. DEGRADATION DU THIABENDAZOLE EN SOLUTION -

L'irradiation d'une solution de thiabendazole par la lumière UV provoque sa décomposition en triazole-4-carboxamide, benzimidazole 2-carboxamide, benzimidazole, triazole-4-ylamidine et méthyl thiazole-4-carboxylate (102, 229).



a = animaux ; p = plantes ; s = sol.

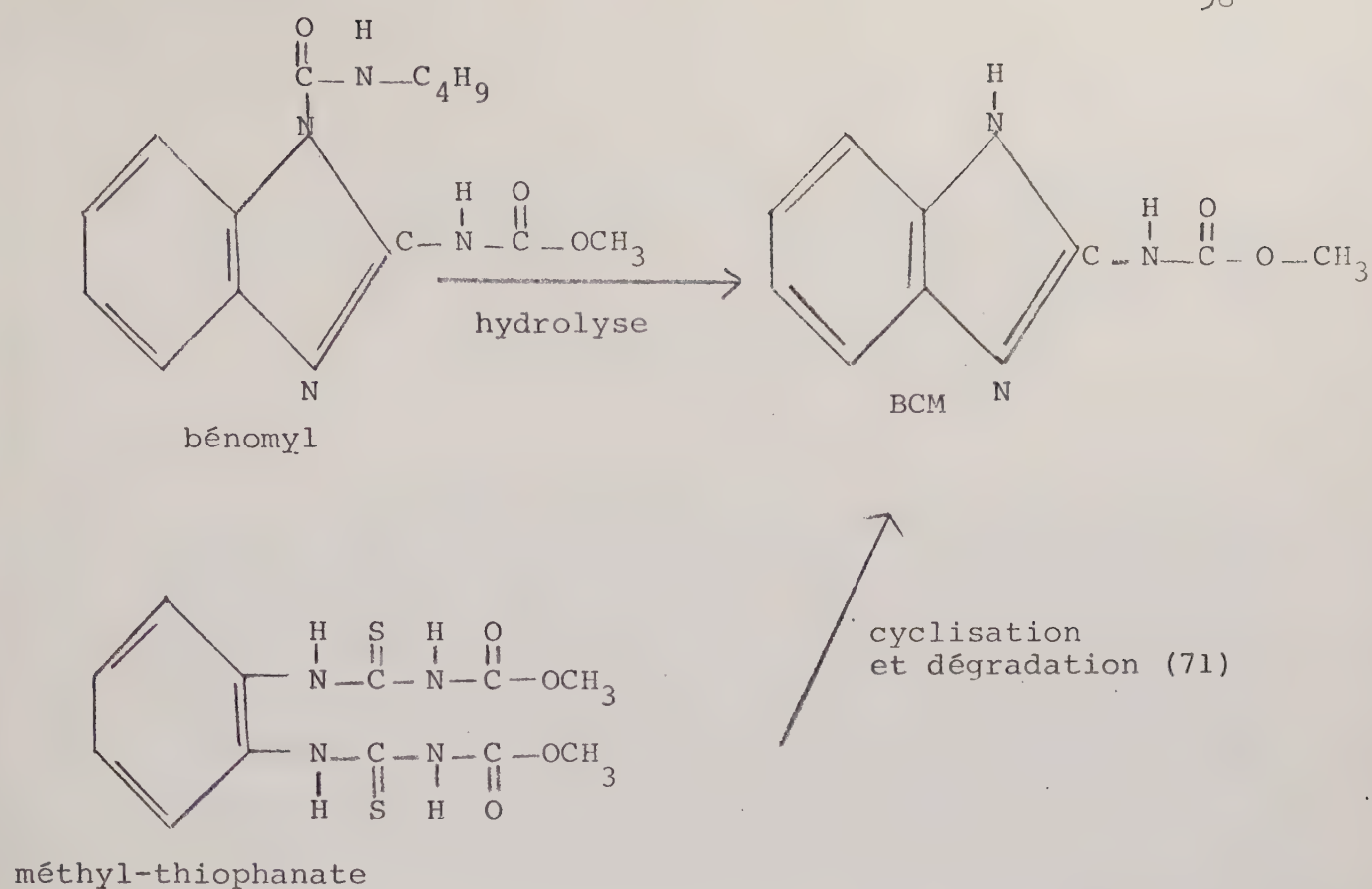


Figure 2 : Transformation du benomyl et du méthyl-thiophanate en BCM. (73)

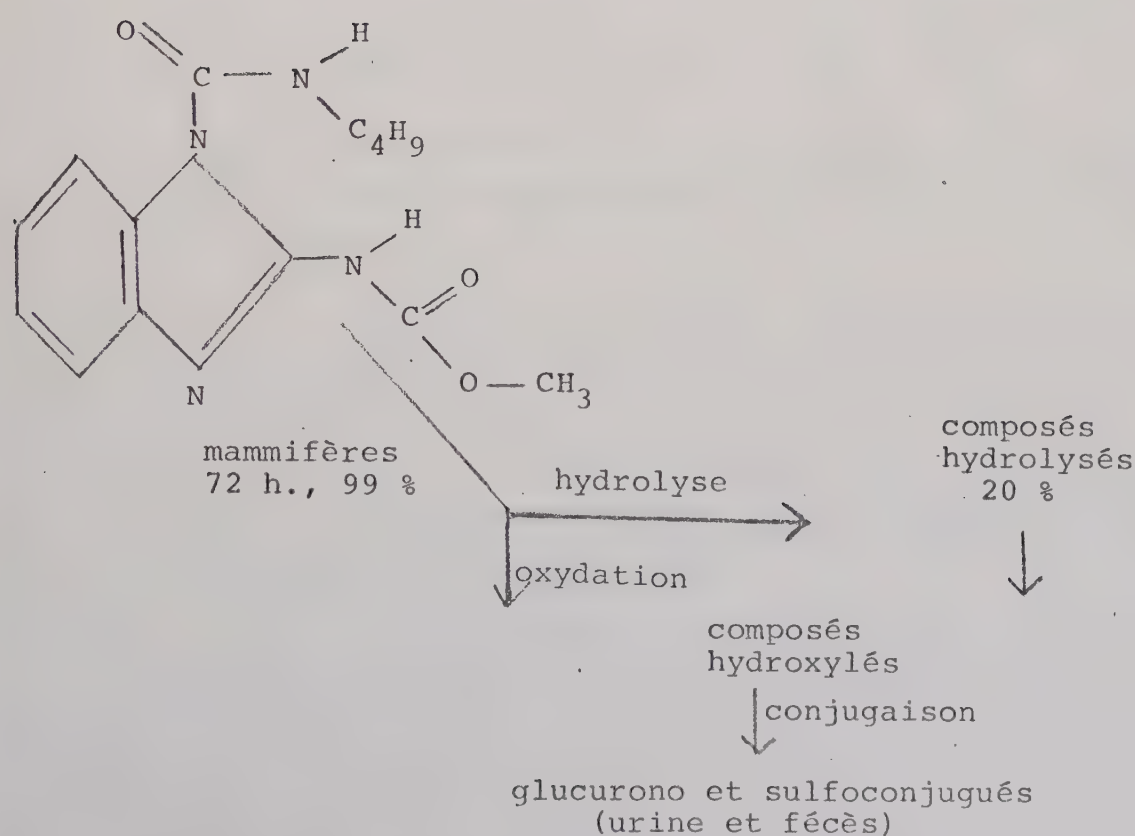


Figure 3 : Métabolisme du benomyl. (168)

7. ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION ET DE LA RÉMANENCE
DES FONGICIDES (BÉNOMYL ET THIABENDAZOLE) DANS LES PLANTES
ET DE LEUR MOBILITÉ DANS LE SOL

Une méthode d'étude de la pénétration des fongicides à travers un segment de plantes a été proposée par ANDREEVA et ses collaborateurs : une culture de champignons est inoculée à des segments d'organes dans une suspension de gel d'agar renfermant 0,01 à 0,1 % de fongicides. La croissance du mycélium dans le segment est inhibée par la pénétration du fongicide à travers la plante (7).

Des études faites sur la pénétration et l'accumulation du bénomyl dans les plantes, après traitement du sol, montrent qu'il s'accumule plus dans le xylème que dans les feuilles ou l'écorce (199).

Ce même fongicide s'est montré sans effet inhibiteur sur la transformation de l'azote dans le sol, que ce soit en laboratoire ou dans la nature (119).

Le bénomyl dans le sol est lentement dégradé en BCM et 2-amino-benzimidazole (170) qui sont peu mobiles dans le sol (180).

Par contre, le bénomyl appliqué aux racines des plantes montre une activité endotherapique puisqu'on a pu le mettre en évidence, après son application, au niveau des feuilles. Son accumulation dans les organes des végétaux est en relation étroite avec l'intensité de la respiration dans ces organes (166).

Le passage du thiabendazole des racines vers les feuilles en fait un fongicide systémique (110).

Il a été démontré qu'il existe une relation entre la teneur de certaines plantes en acide chlorogénique et leur capacité de concentrer le thiabendazole (204).

Des études comparatives entre le thiabendazole et le BCM ont montré que l'absorption par le sol augmente avec son acidité qui provoque une ionisation des fongicides benzimidazoliques. Le thiabendazole est absorbé en plus grande quantité que le BCM, mais sa mobilité dans le sol est plus faible (4).

Quant à la persistance du BCM et du thiabendazole dans le sol, on a constaté que, après 9 mois de délai, à une température de 25°C, dans un sol sec, on retrouve 85 à 95 % de thiabendazole et 65 à 75 % de BCM et, dans un sol humide, 75 à 90 % de thiabendazole et 20 à 30 % de BCM (4).

8. DOSAGE DES FONGICIDES

Les méthodes destinées à la détermination des fongicides dans les agrumes, où de très faibles quantités se trouvent incorporées dans une grande masse de divers produits, comportent généralement les phases suivantes :

I. - EXTRACTION :

- 1) A froid.
- 2) A chaud.

II. - PURIFICATION - SEPARATION - IDENTIFICATION :

- 1) Purification par extraction.
- 2) Séparation par chromatographie sur couche mince :
 - sur silice,
 - sur alumine.
- 3) Séparation par chromatographie sur papier.

III. - DOSAGE :

- 1) Méthodes colorimétriques.
- 2) Méthodes spectrophotométriques en ultra-violet :
 - après purification ;
 - indirectement après élution de la tache sur le chromatogramme.
- 3) Méthodes spectrofluorimétriques.
- 4) Méthodes densitométriques.
- 5) Chromatographie en phase gazeuse.
- 6) Chromatographie liquide-liquide à haute résolution.
- 7) Dosage biologique.

Nous appliquerons ce plan aux différents fongicides que nous devons étudier pratiquement dans ce travail, c'est-à-dire le bénomyl et le BCM, le thiabendazole, le biphényle et l'O-phényl-phénol.

8.1... DOSAGE DU BENOMYL ET DU BCM -

Plusieurs techniques sont proposées (16, 192).

8.1.1. EXTRACTION -

Ce premier temps permet la séparation grossière des fongicides et des huiles essentielles de l'enveloppe du fruit (albedo et flavedo). Cette extraction se fait soit à froid, soit à chaud.

- Extraction à froid :

Les principaux solvants utilisés sont :

- . l'acétate d'éthyle (15, 28, 45, 57, 111, 116, 117, 120, 134, 137, 139, 141, 162, 163, 214) ;
- . le dichlorométhane (116) ;
- . le chloroforme (145, 146, 165, 198) ;
- . l'acétone (3, 11, 114) ;
- . le benzène (233).

- Extraction à chaud :

Des études faites par FERNANDES et al. ont montré que l'extraction du BCM à chaud par l'appareil de Soxhlet est plus efficace que l'extraction à froid. Le meilleur solvant utilisé pour cette extraction est le méthanol (70).

D'autres auteurs extraient le bénomyl à chaud par le méthanol en milieu chlorhydrique, ce qui provoque une conversion du bénomyl en BCM (105).

Divers solvants de migration sont proposés, dont principalement :

- . un mélange éther diéthylique-toluène (1 : 3) (116) ;
- . " " chloroforme-méthanol (1 : 1) (191) ;
- . " " chloroforme-acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2) (231) ;
- . " " éther diéthylique - acide acétique - méthanol (100 : 5 : 2) (14) ;
- . " " chloroforme-acétone (4 : 1) (214) ;
- . " " chloroforme-t-butanol (3 : 1) (57) ;
- . " " benzène-t-butanol (90 : 24) (5) ;
- . " " benzène-t-butanol- diméthylformamide (90 : 24 : 5) (5) ;
- . " " chloroforme - acétate d'éthyle - méthanol (3 : 2 : 1) (13) ;
- . " " chloroforme - acétone - acide acétique (5 : 2 : 0,5) (13) ;
- . " " benzène - acide acétique (5 : 1) (13) ;

Pour éliminer les interférences, certains auteurs utilisent des migrations bidimensionnelles dans deux solvants différents, ce qui permet de séparer le bénomyl des autres fongicides sur la même plaque. Le premier solvant de migration est un mélange benzène-méthanol (9 : 1), le deuxième solvant de migration est un mélange acétate d'éthyle - chloroforme (6 : 4) (224).

Identification des taches : la révélation des taches correspondant au bénomyl ou au BCM se fait de plusieurs manières :

- . si la silice renferme un additif fluorescent à 254 nm, la localisation des taches se fait sous la lumière ultra-violette et les taches apparaissent violettes sur un fond fluorescent (14, 198, 224, 233) ;
- . si la silice ne renferme pas d'additif fluorescent, le bénomyl ou le BCM seront localisés sur la plaque par vaporisation d'un réactif approprié, comme par exemple :
 le N-2,6-trichloro-p-benzoquinonimine pour détecter le BCM (224),
 ou l'iodobismuthate de sodium suivi de vapeurs de brome (15),
 ou encore un mélange d'iodure de potassium, d'amidon en solution aqueuse à 3 % et d'éthanol (1 : 1 : 0,4) (13).

Ce dernier réactif chromogène produit une coloration sensible due à la présence d'un hétérocycle azoté dans la molécule du bénomyl et du BCM.

Certaines méthodes nécessitent, après vaporisation d'un réactif, la localisation des taches sous la lumière UV (214, 224).

Certains auteurs préconisent une méthode biologique par vaporisation des spores de champignons sensibles à l'antifongique et autour de la tache ; il se produit une zone d'inhibition que l'on pourra d'ailleurs mesurer (15, 44, 45, 57, 70, 167).

Après migration sur couche mince, plusieurs travaux ont montré que le bénomyl se décompose en BCM (15).

b) Chromatographie sur alumine :

Les plaques utilisées sont des plaques d'oxyde d'aluminium F₂₅₄ neutre (type E), de 0,2 mm d'épaisseur.

Le solvant de migration est un mélange éther éthylique - méthanol (40 : 1).

La localisation des taches se fait sous lumière UV ou par vaporisation d'une solution d'iodobismuthate de potassium, suivie de vapeurs de brome (14).

. Chromatographie sur papier :

Cette technique est utilisée surtout pour déceler la présence d'un antifongique dans les agrumes sans dosage quantitatif précis (198, 224).

Plusieurs systèmes de solvants sont utilisés :

- . hexane - acétate d'éthyle - acide acétique (40 : 10 : 1) ;
- . chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (45 : 5 : 1) ;
- . acétate d'éthyle - hexane (3 : 2) ;
- . benzène - méthanol (9 : 1) ;
- . acétate d'éthyle - chloroforme (3 : 2).

La localisation des taches se fait sous lumière ultraviolette, ou par vaporisation d'un réactif tel que le 3,5-dichloro-p-benzoquinone dans le cyclohexane (224).

8.1.3. DOSAGE -

Du fait de la présence de noyaux aromatiques dans les molécules du bénomyl et du BCM (et des autres fongicides qui nous intéressent dans ce travail), ceux-ci ont un spectre d'absorption caractéristique en UV.

A cette propriété se rattachent des méthodes d'analyse qualitatives ou quantitatives. Ces méthodes d'analyse peuvent être classées ainsi :

- Les réactions colorimétriques :

- Les méthodes de détermination du bénomyl par colorimétrie sont basées sur la méthode de PEASE.

Cette méthode consiste, après extraction par l'acétate d'éthyle, à hydrolyser le bénomyl en milieu alcalin et à chaud en 2-amino-benzimidazole.

Ce dernier est à son tour extrait par l'acétate d'éthyle, transféré en phase aqueuse acide et réextrait par ce même solvant en milieu alcalin avant d'être transformé en tétrabromo-2-amino-benzimidazole et dosé à 445 nm.

La sensibilité de la méthode est de 0,1 ppm, et un rendement de 87 % a été obtenu (162).

Cette méthode a été améliorée par le même auteur pour différencier le bénomyl des autres fongicides dérivés du benzimidazole (167). Elle a même été reprise par d'autres auteurs qui l'ont modifiée afin d'augmenter le rendement et la sensibilité du dosage (28, 120).

L'une des modifications consiste à changer les étapes d'hydrolyse acide et basique (28).

D'autres auteurs, en appliquant la même méthode, ont pu obtenir un rendement de 94,5 à 100 % et ont pu détecter des concentrations de bénomyl inférieures à 0,05 ppm (120).

- . Une autre réaction colorimétrique a été décrite par PELLIZZARI et GAITER (111, 164), citée par KVALVAG.

Elle consiste à hydrolyser le bénomyl en 2-amino-benzimidazole qui, par addition d'hypochlorite ou d'hypobromite, développe une coloration bleue intense photométrable à 560 nm.

- . Une autre méthode est basée sur la formation d'un complexe en bénomyl-2-diméthyl-amino-2-méthyl-propane-1-ol, après agitation d'une solution aqueuse du fongicide avec une solution chloroformique d'acétate de cuivre et le 1-diméthyl-amino-2-propanol à pH 10,7. Il se développe dans la phase chloroformique une coloration verte que l'on mesure à 420 nm. On peut ainsi doser des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 mg/ml (145, 146).

- Dosage spectrophotométrique dans l'ultra-violet :

Ce dosage se fait :

- . soit sur l'extrait obtenu après purification chimique ;
- . soit indirectement, sur l'éluat de la tache repérée sous UV sur le chromatogramme.

. Dosage après purification classique :

Ce dosage consiste à mesurer la densité optique à deux longueurs d'onde :

- . 275 et 282 nm sur un extrait aqueux acide (après hydrolyse du bénomyl en BCM en milieu ammoniacal) (45, 134, 137, 141) ;
- . et 282 et 288 nm sur un extrait organique (2, 5, 233).

Pour éliminer l'interférence des substances parasites, la densité optique est mesurée par la méthode de la ligne de base en traçant la tangente entre la valeur minimale à 250 nm et le retour à la ligne de base à 295 nm. Le rendement est de 85 % (139).

Une technique a été mise au point par MESTRES et al. pour le dosage simultané du BCM : benzimidazole carbamate de méthyle et du thiabendazole (139).

Lorsque les deux fongicides coexistent dans un extrait, leur identification qualitative est assurée par la perception des bandes nettement différentes du BCM vers 275 et 282 nm, d'une part, et de la bande la plus large de thiabendazole dont le maximum se situe vers 303 nm, d'autre part (139).

• Dosage après élution des taches d'un chromatogramme :

Les taches du bénomyl repérées sur le chromatogramme sont éluées par le méthanol et dosées en ultra-violet à 287 nm.

Le rendement de la méthode est de 80 à 100 % et la limite de détection est de 0,05 ppm de bénomyl (234).

Le BCM lui-même est élué par l'acide acétique et dosé à 282 nm (2).

- Dosage spectrofluorimétrique :

Le dosage du bénomyl par spectrofluorimétrie permet de déceler des quantités de l'ordre de 0,1 ppm.

Une première méthode consiste à hydrolyser le bénomyl en 2-amino-benzimidazole après purification de l'extrait et à mesurer l'émission à 355 nm en utilisant une excitation à 285 nm (162, 163).

Le rendement de la méthode est de 91 % pour des concentrations de l'ordre de 0,10 à 2,1 ppm (162).

Une autre méthode consiste à purifier le bénomyl sur une colonne d'oxyde de magnésium et de célite après conversion en BCM, et à finir le dosage par spectrofluorimétrie.

$\lambda_{\text{excitation}} = 287 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{émission}} = 307 \text{ nm}$.

Le rendement de la méthode est voisin de 70-75 %, la limite de détection est voisine de 0,5 ppm de BCM (3).

- Dosage par densitométrie directe :

Cette méthode consiste à séparer le bénomyl après migration dans un solvant approprié, à localiser la tache correspondante au témoin sous lumière ultra-violette, puis à faire un dosage par fluorimétrie directement sur la plaque (19, 116, 191).

Les surfaces des pics sont évalués par un planimètre. La linéarité de réponse du bénomyl est située entre 2 et 80 ng/ μ l.

La reproductibilité de la méthode est étudiée en utilisant, pour chaque concentration, 4 plaques au minimum (116).

- Chromatographie en phase gazeuse :

Aucune technique n'a été proposée pour le bénomyl.

- Chromatographie liquide-liquide haute résolution :

Cette méthode peut s'appliquer au dosage du bénomyl, du carbendazime (BCM), du thiabendazole, du thiophanate ... (10, 104, 105, 117).

- . Une méthode a été récemment mise au point pour le dosage du bénomyl après hydrolyse en 2-amino-benzimidazole, en utilisant un spectrofluorimètre comme détecteur. Le chromatographe est équipé de Hitachi Gel N° 3010, la température de la colonne est de 45°. La phase mobile est formée d'un mélange acide acétique - méthanol à 0,1 % (v/v), le débit étant de 1,2 ml/min. λ excitation = 265 nm - λ émission = 315 nm.

Les limites de détection obtenues sont 20 ng.

- . Une autre méthode a été mise au point, qui permet de séparer plusieurs fongicides.

Le détecteur utilisé est un spectrophotomètre. Le dosage est effectué à 254 nm (10).

- Dosage biologique :

Les extraits d'agrumes (fruits entiers ou écorces) sont soumis à une chromatographie sur couche mince. On repère les spots, puis on soumet la plaque à un réactif biologique. Plusieurs techniques ont été mises au point (15, 44, 45, 57, 70, 167).

- . L'une de ces méthodes consiste, après migration sur silice fluorescente, à soumettre la plaque aux vapeurs de brome. Après dessiccation, on pulvérise une solution d'enzymes (estérase tirée de l'abeille), puis après un certain temps, un agent chromogène. Cet agent chromogène, ester du bêta-naphtol, est hydrolysé par les enzymes, sauf au niveau des antifongiques qui apparaissent donc en blanc sur fond magenta. Le thiabendazole est retrouvé à 79 % et le bénomyl à 40 % (214).

- . Une autre méthode permet de doser plusieurs fongicides sur une même plaque par comparaison des Rf.

Elle consiste à repérer les spots en UV ou par pulvérisation d'iodobismuthate de potassium, puis à pulvériser une suspension de spores de champignons microscopiques (*Cladosporium cladosporides*) et terminer par une incubation à 25°C en atmosphère humide pendant deux jours.

On évalue les fongicides par identification des zones d'inhibition de croissance :

<u>Fongicide</u>	<u>Détection limite</u>
Thiabendazole.....	0,05 µg (soit 2 mg/kg de fruit)
BCM.....	0,01 µg (soit 0,5 mg/kg de fruit)
Bénomyl.....	0,05 µg (soit 1 mg/kg de fruit) (correspondant à 0,02 µg de BCM)
Méthyl-thiophanate	0,02 µg (soit 1 mg/kg de fruit)

Ces méthodes sont spécifiques mais très longues, d'où la mise au point d'autres techniques plus rapides et surtout, dernièrement, la chromatographie liquide-liquide haute résolution.

8.2... METHODES DE DOSAGE DU THIABENDAZOLE -

8.2.1. EXTRACTION -

- Extraction à froid :

La plupart des auteurs procèdent à une extraction à froid par l'acétate d'éthyle (3, 15, 24, 66, 93, 108, 133, 136, 138, 139, 140, 144, 146, 153, 154, 176, 178, 214, 216, 217).

D'autres solvants sont aussi utilisés :

- . le dichlorométhane (108, 178) ;
- . le chloroforme (93, 146, 176) ;
- . l'acétone (3).

- Extraction à chaud :

En utilisant souvent une extraction dans un appareil de Soxhlet par le dichlorométhane (92, 160, 182).

8.2.2. PURIFICATION - SEPARATION - IDENTIFICATION -

- Purification par extraction liquide-liquide :

Le principe est le suivant : l'extrait organique est lavé par la soude, puis l'eau distillée. Le thiabendazole est extrait en milieu acide chlorhydrique aqueux, puis par l'acétate d'éthyle en milieu alcalin. Après un dernier lavage à l'eau distillée, une solution chlorhydrique extrait enfin le thiabendazole purifié (66, 133, 136, 138, 205, 211).

Certains auteurs utilisent une double purification. Après lavage de l'extrait par l'acétone, l'eau et l'acétate d'éthyle, ils le font passer sur une colonne d'oxyde de magnésium et de célite (3).

- Séparation par chromatographie :

. Chromatographie sur couche mince :

a) Chromatographie sur gel de silice :

La silice est l'adsorbant le plus utilisé (14, 60, 160, 178, 214), parfois additionné d'un additif fluorescent à 254 nm (92, 108).

Les solvants utilisés sont :

- . benzène - acide acétique - eau (50 : 20 : 5 : 2) (60, 108) ;
- . chloroforme - méthanol (49 : 1) (153) ;
- . acétate d'éthyle - méthyl-éthyl-cétone - acide formique (5 : 3 : 1 : 1) (160) ;
- . chloroforme - acétone (4 : 1) (214).

La localisation des taches se fait :

- . soit sous lumière ultra-violette ;
- . soit par vaporisation d'un réactif comme l'iodobismuthate de sodium suivi des vapeurs de brome (14) ou le réactif de Dragendorff (178) ;
- . soit par vaporisation d'un réactif biologique comme les spores de *Cladosporium cladosporides* (15).

b) Chromatographie sur alumine :

Elle consiste à utiliser de l'oxyde d'aluminium F₂₅₄ et à faire des plaques de 0,2 mm d'épaisseur (153).

La migration se fait dans un mélange chloroforme - méthanol (49 : 1).

La localisation des taches est effectuée sous lumière ultra-violette.

. Chromatographie sur colonne :

Il a été proposé d'effectuer une préséparation du thiabendazole sur colonne d'alumine avec l'hexane comme solvant. L'éluat est ensuite déposé sur couche mince de silice GF₂₅₄ avec le mélange solvant : chloroforme - méthanol (19 : 1) (217).

8.2.3. DOSAGE -

- Les réactions colorimétriques :

À partir de l'éluat de la tache repérée sous lumière ultra-violette sur le chromatogramme, il se développe une coloration bleue (photométrable à 605 nm) en présence de p-phénylène diamine et de Fe^{+++} . La limite de détection est de 0,1 ppm (108).

Cette réaction a été transformée par WHITE en une méthode automatique de dosage du thiabendazole. La mesure est effectuée à 610 nm et le rendement est de 95-100 % avec une déviation standard de 1,2 % (234).

Une autre réaction est obtenue par addition de l'acétate de cuivre, de 1-diméthyl-amino-2-propanol et d'hydroxyde de sodium en milieu chloroformique. Il se développe, dans la phase chloroformique, une coloration verte mesurée par spectrophotométrie (146).

- Dosage spectrophotométrique dans l'ultra-violet :

. Dosage après purification :

Une première méthode consiste à mesurer la densité optique à 302-303 nm (93, 176), ce qui permet de déceler jusqu'à 0,1 ppm avec un rendement allant de 94 à 101 % (176).

Mais comme le bénomyl interfère, il est préférable de tracer le spectre d'absorption de 230 nm à 350 nm (138, 139).

Pour le thiabendazole, comme pour le bénomyl, MESTRES et al. ont proposé de faire la mesure de la densité optique en considérant comme ligne de base du spectre les deux minima qui se situent : l'un à 295 nm, l'autre à 318 nm.

Puis, on mesure un rapport $\frac{\text{D.O.303}}{\text{D.O.295}}$ qui doit être égal à

$\frac{\text{D.O.303}}{\text{D.O.318}}$. On élimine ainsi l'interférence du bénomyl.

. Dosage après élution d'un chromatogramme :

Elle consiste à éluer la tâche repérée sous lumière ultraviolette dans du méthanol et à faire le dosage à 300 nm.

La limite de détection est de 0,1 mg/kg et le rendement est supérieur à 95 % (92).

- Dosage spectrofluorimétrique :

Le thiabendazole présentant en ultra-violet une fluorescence importante, plusieurs méthodes ont été proposées (3, 144, 153, 159, 160) :

Le thiabendazole est extrait par l'acétate d'éthyle, puis soumis à une chromatographie sur couche mince d'alumine.

Le chromatogramme est élué par le méthanol-HCl 0,1 N (99 : 1), puis on compare l'intensité de fluorescence à celle d'une gamme étalon :

- . longueur d'onde d'excitation..... 302 nm
- . longueur d'onde d'émission..... 355 nm (153).

La limite de détection est de 0,1 ppm et le rendement est de 95 à 99 % (156).

Le dosage par spectrofluorimétrie est plus sensible que le dosage par spectrophotométrie dans l'ultra-violet : en effet, pour des concentrations supérieures à 1 ppm, on utilise la spectrophotométrie dans l'ultra-violet et, pour des concentrations inférieures à 1 ppm, on utilise la spectrofluorimétrie (144, 155);

La méthode de dosage du thiabendazole par spectrofluorimétrie a été automatisée : $\lambda_{\text{excitation}} = 315 \text{ nm}$ -
 $\lambda_{\text{émission}} = 360 \text{ nm}$ (159).

- Dosage par densitométrie directe :

Le thiabendazole est séparé sur une couche de silice avec le benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2) comme solvant.

Puis, les plaques sont soumises à une fluorimétrie directe avec $\lambda_{\text{excitation}} = 310 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 355 \text{ nm}$.

Le coefficient de variation pour 50 à 200 ng de thiabendazole par spot est de 1,5 % (60).

- Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

Plusieurs techniques sont proposées (24, 92, 133, 140, 211, 216, 217).

La méthode de MESTRES consiste, après transfert du résidu de l'extrait aqueux final dans une solution alcoolique, à rechercher le thiabendazole par chromatographie gazeuse en utilisant un détecteur à photométrie de flamme avec filtre à 394 nm sensible au soufre, ou un détecteur thermoionique au sulfate de rubidium sensible à l'azote.

La colonne est en pyrex ($L = 1,20 \text{ m}$ et $\varnothing \text{ ext.} = 1/4''$) avec le détecteur à photométrie de flammes et de $1/8''$ avec le détecteur thermoionique et garnie de DC 200 à 10 % ou OV 17 à 3 % sur Chromosorb W. HMDS 80/100. La température de l'injecteur = 250°C , celle de la colonne = 210 à 230°C .

La perception de 10 ng de thiabendazole, après injection de 5 μl de l'extrait final méthylé concentré à 1 ml assure le contrôle des résidus à partir de 0,4 mg/kg dans les écorces, soit environ 0,12 mg/kg dans les fruits entiers et à partir de 0,04 mg/kg pour les fruits pelés et les pulpes (138).

Une autre technique permet de détecter des concentrations inférieures à 0,1 ppm avec un rendement qui varie de 90 à 94,9 %. L'auteur utilise un détecteur à ionisation de flamme et une colonne à 10 % de DC-200 sur Gas-Chrom Q (80-100 mesh) à 240°C . Le thiabendazole est identifié après méthylation en N-méthyl-thiabendazole (211).

- Chromatographie liquide-liquide à haute résolution :

On a essayé d'appliquer les mêmes techniques de dosage du bénomyl au thiabendazole (10, 117).

L'une de ces méthodes consiste à utiliser une colonne de 500 x 2,1 mm chargée de Hitachi gel N° 3010-CH₂OH avec 5 % (V/V) d'acide acétique - méthanol comme phase mobile.

Le détecteur est un spectrofluorimètre avec λ excitation = 305 nm et λ émission = 355 nm.

La sensibilité de la méthode est grande et permet de doser des concentrations de l'ordre de 0,001 ppm avec un rendement variant entre 90,5 et 102,9 % (117).

Une autre méthode consiste à utiliser une colonne de 0,5 m avec Permaphase ETH et 10 % de méthanol dans du tampon.

Le détecteur utilisé est un spectrophotomètre dans l'ultra-violet et le dosage se fait à 300 nm (10).

- Dosage biologique :

Les extraits d'agrumes sont, comme pour le bénomyl, soumis à une chromatographie sur couche mince. Les taches repérées sont soumises à un réactif biologique. Il se forme autour de la tache une zone d'inhibition de la croissance du champignon que l'on pourra mesurer et comparer avec un témoin de thiabendazole (15, 66, 94).

Mais le rendement obtenu est seulement de 77 % (66).

8.3... METHODES DE DOSAGE DU BIPHENYLE -

8.3.1. EXTRACTION -

- Extraction à froid :

Les solvants utilisés sont :

- . le dichlorométhane (95, 178, 203) ;
- . l'éther éthylique (42, 123, 147, 151) ;

- . l'acétate d'éthyle (217) ;
- . l'éther de pétrole (37) ;
- . le cyclohexane (235) ;
- . l'acétonitrile (84).

- Extraction à chaud :

Les solvants utilisés sont :

- . l'hexane (43, 209, 210) ;
- . le cyclohexane (40, 78, 129, 132, 231) ;
- . l'éther de pétrole (20).

Certains auteurs extraient le biphényle par entraînement à la vapeur d'eau, le distillat est recueilli dans une phase organique (142, 202, 205, 210, 222).

8.3.2. PURIFICATION - SEPARATION - IDENTIFICATION -

- Purification par extraction liquide-liquide :

Elle consiste à faire passer le biphényle d'une phase organique, le cyclohexane le plus souvent (132, 200, 231, 232) ou l'hexane (209, 210) dans une phase aqueuse acide.

Certains auteurs recueillent le distillat de l'entraînement à la vapeur d'eau dans de la soude, puis ils extraient le biphényle dans du cyclohexane (142).

Une technique propose même un passage de l'extrait sur une colonne d'acide sulfurique (84).

- Séparation par chromatographie :

. Chromatographie sur couche mince :

a) Chromatographie sur couche mince en gel de silice :

C'est l'adsorbant qui a été le plus souvent utilisé (6, 40, 42, 43, 95, 169, 178, 185, 205, 208, 212).

Le solvant de migration utilisé est en général peu polaire comme :

- . l'éther de pétrole (42) ;
- . l'hexane (43, 205) ;
- . l'heptane (95) ;
- . un mélange dichlorométhane - cyclohexane (1 : 3) (40, 169) ;
- . un mélange shellsol A - acide acétique (24 : 1) (185).

La localisation des taches de biphényle se fait sous lumière ultra-violette si la silice renferme un additif fluorescent (6, 205) ou par pulvérisation d'un réactif comme la fluorescéine de sodium à 0,2 % dans le méthanol, suivie des vapeurs de brome (42), ou bien un mélange formaldéhyde à 35 % et d'acide sulfurique concentré (50 : 1) (40, 95).

D'autres auteurs utilisent le 2,4,7-trinitro-9-fluorenone dans l'acétone (168).

b) Chromatographie sur alumine :

Cette technique consiste à utiliser l'oxyde d'aluminium G en couche mince de 1 mm d'épaisseur.

La migration se fait dans le 2-méthyl-butane et la localisation des taches se fait par pulvérisation des vapeurs d'iode (120).

. Chromatographie sur colonne :

Certains auteurs préfèrent purifier le biphényle sur colonne d'alumine avec élution par l'hexane (216, 217).

. Chromatographie sur papier :

Pour une détection rapide du biphényle, SPERLICH (203) utilise une chromatographie sur papier.

Cette technique consiste à extraire le biphényle par le dichloro-méthane, à déposer l'extrait sur papier, puis à faire la migration dans un solvant méthanol-eau. La révélation s'obtient par pulvérisation du 2,4,7-trinitrofluorene-9-one dans l'acétone.

Cette technique est, bien entendu, qualitative (203).

8.3.3. DOSAGE -

Plusieurs réactions ont été proposées pour la recherche et le dosage du biphényle.

- Les réactions colorimétriques :

. Réaction de JONOVSKY :

Cette réaction consiste à traiter le biphényle par une solution d'acide nitrique et d'acide sulfurique à chaud.

Le produit de nitration obtenu donne une coloration rouge pourpre photométrable à 550 nm, après passage dans l'alcool isobutylique et lavage par l'acétone et la soude.

Le dérivé nitré du biphényle est identifié comme le 2,2',4,4'-tétranitrobiphényle.

La loi de Beer est suivie pour des concentrations de biphényle allant de 2 à 40 µg dans 3,5 ml du mélange réactif (209, 210).

- . D'autres auteurs utilisent l'action de l'acide sulfurique, des traces de formaldéhyde et de fer ferrique sur le biphényle qui développe une coloration bleue intense stable.

Cette méthode est utilisée pour doser le biphényle dans les papiers d'emballage (173).

- Dosage spectrophotométrique dans l'ultra-violet :

Ce dosage est dû à la présence de deux noyaux aromatiques dans la formule du biphényle qui présente une absorption caractéristique dans l'ultra-violet.

. Dosage après purification chimique :

Le principe de ces méthodes consiste, après purification de l'extrait, à tracer le spectre d'absorption du biphényle dans un solvant organique entre 300 et 200 nm et à mesurer la densité optique à 248 nm (129, 130, 131, 132, 142, 200, 231).

Le rendement de cette technique varie de 90 ± 5 (131) à 100 % (142).

Une méthode automatique de dosage du biphenyle dans l'ultra-violet a été mise au point avec une limite de détection maximum de 1 ppm (78).

• Dosage après élution :

Consiste à éluer la tache repérée sur couche mince dans du méthanol ou de l'éthanol et à tracer le spectre et faire le dosage à 248 nm (151).

Le rendement de cette technique est de 90 ± 5 % (205) et la limite de détection est de 2 ppm (205).

- Les réactions spectrofluorimétriques :

Le biphenyle présente une fluorescence importante. Une méthode de dosage en spectrofluorimétrie a été proposée par Mc CARTHY en 1965.

Cette méthode consiste à séparer le biphenyle par chromatographie sur couche mince d'alumine, à éluer la tache correspondant au témoin par l'éthanol et à mesurer la fluorescence à 470 nm en utilisant une excitation à 275 nm.

Le rendement de la méthode est de 93 à 110 % (123).

- Dosage par densitométrie directe :

Aucune technique n'a été proposée.

- Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse a d'abord servi de technique de dégrossissage en permettant d'identifier le biphenyle. En effet, les détecteurs à conductivité thermique ne permettaient pas d'obtenir une sensibilité suffisante (37, 128, 129, 221).

Puis, l'apparition des détecteurs à ionisation de flamme a permis des possibilités meilleures atteignant des concentrations de 0,5 ppm avec des rendements de 95 % (216, 222).

- Chromatographie liquide-liquide à haute résolution :

Aucune technique n'a été proposée.

- Dosage biologique :

Aucune technique n'a été proposée.

8.4... METHODES DE DOSAGE DE L'O-PHENYL-PHENOL -

Les méthodes de dosage de l'O-phényl-phénol coïncident avec celles du biphényle et, en général, ces deux fongicides sont extraits et dosés ensemble.

8.4.1. EXTRACTION -

- Extraction à froid :

Les solvants utilisés sont :

- . l'éther éthylique (42, 147, 151) ;
- . le dichlorométhane (95, 178, 203) ;
- . le chloroforme (174) ;
- . l'acétate d'éthyle (216) ;
- . l'acétonitrile (50, 84).

- Extraction à chaud :

Les solvants utilisés sont :

- . l'éther de pétrole (20) ;
- . le tétrachlorure de carbone (142) ;
- . le cyclohexane (232) ;
- . le chloroforme (205) ;
- . le dichlorométhane (205) ;
- . une solution saturée au demi chlorure de sodium contenant 10 ml de H_2SO_4 concentré par litre (169)

8.4.2. PURIFICATION - SEPARATION - IDENTIFICATION -

- Purification par extraction liquide-liquide :

Cette purification consiste, comme pour les autres fongicides, à faire passer l'O-phényl-phénol d'un milieu alcalin à un milieu acide, et vice-versa, pour éliminer les impuretés.

La technique proposée par RAJZMAN (72) consiste, après extraction par le chloroforme, à transférer l'O-phényl-phénol en milieu alcalin, puis, après acidification, à réextraire par le chloroforme (174).

Le même mode de purification est utilisé par d'autres auteurs (142, 205, 232).

Une technique propose même, après purification par l'éther de pétrole et le dichlorométhane, de faire passer l'extrait sur une colonne d'acide sulfurique (84).

- Séparation par chromatographie :

Si les méthodes de purification de l'extrait par extraction liquide-liquide ne sont pas nombreuses, il n'en est pas de même pour la purification par chromatographie, surtout par chromatographie sur couche mince.

. Chromatographie sur couche mince :

L'adsorbant utilisé est le gel de silice.

De nombreux auteurs utilisent cette technique (6, 42, 95, 169, 178, 185, 205).

Le solvant de migration, comme pour le biphényle, est peu polaire. Il s'agit de :

- . l'éther de pétrole (42) ;
- . le dichlorométhane (95) ;
- . un mélange dichlorométhane - cyclohexane (1 : 3) (169) ;
- . un mélange hexane - éthanol - chloroforme (151) ;
- . un mélange hexane - CHCl_3 - acétone (67 : 25 : 8) (205).

La localisation des taches se fait soit sous lumière ultra-violette (154, 205), soit par vaporisation d'un réactif approprié comme :

- . le fluoroborate de p-nitrobenzène diazonium (50) ;
 - . la fluorescéine de sodium en solution méthanolique, suivie des vapeurs de brome (42) ;
 - . le 2,6-dibromoquinone chlorimide dans l'éthanol (169, 185) ;
 - . ou enfin, le mélange formaldéhyde à 35 % - acide sulfurique concentré (50 : 1) (95).
- . Chromatographie sur colonne :

Certains auteurs font une double purification :

- . sur colonne de florisil (50) ou d'alumine (217) ;
- . puis une séparation sur couche mince de silicagel (50, 217).

L'élution de la colonne se fait par un mélange ammoniacal - méthanol (1 : 4) (216).

8.4.3. DOSAGE -

- Les réactions colorimétriques :

Plusieurs méthodes sont proposées :

- . La réaction d'EMERSON appliquée par MESTRES. Un homogénéisat d'écorces est soumis à l'entraînement à la vapeur d'eau. Le distillat recueilli dans une solution de tampon à pH 10,5 est extrait par le tétrachlorure de carbone, d'où l'O-phényl-phénol est réextrait par une solution de soude normale.

Le dosage est effectué sur cette dernière solution aqueuse en faisant agir la 4-amino-antipyrine en milieu alcalin et en présence d'un oxydant, le ferricyanure de potassium (131, 142).

- . Une autre réaction est basée sur une coloration spécifique rose donnée par l'O-phényl-phénol avec l'acide sulfurique, en présence de traces de formaldéhyde et de Fe^{+++} ;

Cette méthode permet de déceler jusqu'à 0,05 ppm d'O-phényl-phénol dans la pulpe, 0,3 ppm dans l'écorce et 0,1 ppm dans le fruit entier (174).

Cette même réaction colorimétrique a été utilisée par d'autres auteurs (95, 205).

- Les réactions spectrophotométriques dans l'ultra-violet :

. Après purification chimique :

Aucune.

. Après élution :

Une réaction consiste à séparer l'O-phényl-phénol sur une plaque de silice, à pulvériser la plaque par la fluorescéine de sodium en solution méthanolique, à éluer la tache dans le méthanol et à mesurer l'extinction à 211 nm (42).

- Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

Plusieurs techniques sont mises au point en vue de ce dosage (20, 84, 128, 129, 147, 216, 217, 232).

Certains auteurs utilisent des colonnes en verre de 3 mm x 0,75 - 1,5 m, remplies de SE-30 sur Chromosorb, d'autres utilisent comme phase stationnaire de l'éthandiol adipate polyester sur Chromosorb.

On utilise le plus souvent un détecteur à ionisation de flamme (147, 216, 217).

On peut ainsi détecter 0,8 ppm et avoir un rendement de 95,4 % (216).

9. TOXICOLOGIE

La toxicité des fongicides étudiés est très faible, comme le montre le tableau des DL_{50} , et il faut véritablement un accident pour connaître leur toxicité aiguë.

De par leur utilisation généralisée et parfois abusive, ces produits exposent obligatoirement l'homme - leurs utilisateurs en premier lieu, les consommateurs ensuite - à des risques d'intoxication. Cette intoxication peut avoir l'allure d'une atteinte aiguë ou d'une affection chronique : en fonction de la nature du produit, de la durée d'exposition et de l'intensité de l'imprégnation.

9.1... INTOXICATION HUMAINE -

Le risque s'observe surtout dans les industries de fabrication de fongicides ou durant le traitement des plantes, quelques accidents ont été signalés dans une industrie fabriquant des emballages imprégnés au diphényle. On a relevé 9 cas d'intoxication, dont un mortel. Après avoir été soumis durant 11 ans à des concentrations en diphényle atteignant jusqu'à 120 mg/m^3 - alors que la tolérance aux U.S.A. est de 1 mg/m^3 maximum - un homme est mort d'une nécrose hépatique. A l'autopsie, l'atteinte histologique du foie et des reins a été constatée. Le sujet présentait auparavant des troubles caractériels, une anémie, enfin une atteinte nerveuse centrale et périphérique.

Les autres atteintes se présentaient sous forme de cirrhoses, avec des signes de fatigue et d'irritabilité (85).

GERARDE et SAX considèrent que le biphényle par inhalation peut aboutir à des lésions des voies respiratoires (75, 186).

Le biphényle a été signalé comme responsable d'un accident qui a eu lieu en France, à l'intérieur d'une usine fabriquant des emballages imprégnés de biphényle, à Strasbourg. Les ouvriers prenaient des nausées, des vomissements et des accès de toux dus à des vapeurs blanches irritantes. Une enquête a mis en évidence le biphényle comme agent responsable, à cause de sa trop forte concentration dans l'air de l'usine (230).

Pour ces raisons, DEICHMANN estime que la concentration limite tolérable du biphényle dans l'air doit être fixée à 0,5 ppb.

Pour Mc CORNACK, le bénomyl lui-même n'est pas irritant pour les yeux et les ongles (124).

9.2... INTOXICATION EXPERIMENTALE CHEZ L'ANIMAL -

L'étude de la toxicité des fongicides a été envisagée sous ses différentes formes :

9.2.1. LA TOXICITE AIGUE -

La toxicité aiguë des fongicides est donnée par le tableau des DL_{50} (tableau 2) (98, 110, 213, 218).

On observe, en présence de fortes doses de thiabendazole, des atteintes transitoires du système nerveux central. Sa toxicité se manifeste par une réduction de l'activité, une dépression et une ataxie (90).

Cette toxicité est en relation avec la diffusion rapide du produit dans le sang et le système nerveux.

L'absorption de biphényle en quantité suffisante donne une intoxication aiguë caractérisée par un rythme respiratoire perturbé, du larmolement, une perte d'appétit s'accompagnant d'une perte de poids et de faiblesse musculaire. La mort survient par suite de difficultés respiratoires conduisant au coma et accompagnées de tremblements (230).

9.2.2. LA TOXICITE CHRONIQUE -

De nombreuses recherches ont été effectuées sur la toxicité chronique des fongicides chez le rat, le lapin, la chèvre, durant des périodes allant de quelques semaines à quelques années.

- Le biphényle :

L'étude du biphényle a été effectuée durant un an chez le chien, deux ans chez le rat qui est l'espèce la plus sensible et a montré que l'un des sites d'action toxique du biphényle était le rein.

A raison d'une dose journalière per os de 50 mg/kg de poids corporel, le rat est atteint de troubles fonctionnels discrets : polyurie. Au-delà de cette dose, c'est une inflammation, puis une ulcération du rein, et enfin l'atrophie des tubules rénaux, qui se produisent (77).

Par contre, à la dose de 25 mg/kg de poids, que ce soit par injection sous-cutanée, application répétée sur la peau, ou par inhalation des vapeurs, il ne se manifeste aucune intolérance, aucun effet cumulatif significatif (77, 149).

Le biphényle peut être à l'origine d'une dilatation tubulaire chez le rat nourri pendant 165 jours à raison de 0,5 % de son alimentation, mais cette atteinte est réversible (26).

- Le thiabendazole :

Des études faites sur la toxicité chronique du thiabendazole ont montré que de larges doses sont tolérées par les rats (de 12,5 à 400 mg/kg/jour durant 180 jours) sans mortalité (90).

- Le bénomyl :

Que ce soit à raison d'une dose unique de 3,6 g/kg ou d'une administration prolongée pendant 12 mois avec 1 g/kg, on n'observe pas de toxicité générale ni d'effets hépatotoxiques (218).

Des études sur l'effet tératogène du bénomyl et sur son action sur la reproduction chez les animaux de laboratoire ont été effectuées et ont montré qu'il n'y a aucun effet avec une alimentation à 0,5 % de bénomyl (191).

En plus, il ne s'accumule pas, puisqu'on ne l'a pas retrouvé dans les tissus des rats et des chiens nourris pendant deux ans à 2500 ppm (74).

- TABLEAU 2 -

PRODUIT	DL ₅₀ (mg/kg)							D. J. A. (mg/kg/jour)
	VOIE ORALE					VOIE SC	VOIE IP	
	Rat	Souris	Lapin	Chien	Caille	Rat	Rat	
BENOMYL.....	9600							n'est pas encore fixée par OMS faute de données suffisantes
BCM.....	>1500			>2500	>10000	>2000	>15000	
THIABENDAZOLE.....	3330	3810	3850					0,05
BIPHENYLE.....	3280		2410					0,125
O-PHENYL-PHENOL.....	2480							1,0
METHYL-THIOPHANATE..	7500					>10000	>1640	

10. ASPECT LEGISLATIF

REGLEMENTATION -

Ce n'est qu'au cours de 1959 que le bulletin du Laboratoire coopératif parle pour la première fois à ses lecteurs du traitement des agrumes contre les moisissures ; traitement qui était encore, à l'époque, inconnu des consommateurs.

Le principe général de la réglementation française des additifs est que tout additif est interdit s'il n'a pas explicitement été autorisé par un arrêté pris après avis favorable du Conseil supérieur d'hygiène publique de France et de l'Académie de médecine (décret du 12 février 1973).

L'arrêté du 20 juillet 1956 précise que tout traitement des fruits après la récolte doit faire l'objet d'un arrêté d'autorisation.

L'arrêté du 30 août 1968 autorise pour le traitement en surface des agrumes, ou pour l'imprégnation des matériaux utilisés pour leur conditionnement, l'emploi de trois substances, en précisant leur taux résiduel maximal autorisé :

- le biphényle ou diphényle à 70 mg/kg de fruit entier ;
- l'ortho-phényl-phénol à 12 mg/kg de fruit entier ;
- l'ortho-phényl-phénate de sodium à 12 mg/kg exprimés en O.P.P. ;

avec obligation d'indiquer le traitement d'une façon apparente et lisible.

Plus tard, des circulaires administratives ont autorisé le bénomyl et le thiabendazole : le 30 mars 1971, une directive du Conseil des communautés européennes a admis le traitement par le thiabendazole en fixant le taux maximum résiduel à 6 mg/kg de fruits entiers. Mais après une étude statistique des résultats d'analyses montrant que lorsque le thiabendazole est utilisé pour empêcher efficacement la pourriture et supprimer la sporulation, beaucoup de fruits contiendraient une quantité de résidus très supérieure à 6 ppm, les participants du groupe de travail FAO et OMS d'experts des résidus de pesticides ont proposé une modification de la tolérance de 6 ppm à 10 ppm (158). Le 23 février 1972, une circulaire a toléré l'emploi du bénomyl pour les agrumes après récolte, en autorisant leur trempage dans des solutions ne contenant pas plus de 500 mg/litre de produit actif et en fixant le taux maximum résiduel à 1,5 mg/kg de fruit entier. De plus, le bénomyl doit être utilisé seul et le traitement doit être porté à la connaissance du public (9).

Tous ces traitements doivent être indiqués (51).

Aux U.S.A., outre le biphényle, l'O.P.P. (Dowicide 1) et son sel de sodium (Dowicide A), sont admis : le borax et l'acide borique. Un autre antifongique est autorisé, mais seulement sur les citrons : il s'agit de l'ester isopropylique du 2-4-D (125), appliqué sous forme d'enduit cireux après la récolte (187).

Le bénomyl, d'après le "Food Drug and Cosmetic Act", peut atteindre 10 mg/kg en bénomyl et métabolites contenant pour moitié du benzimidazole dans ou sur les fruits (8). Tandis qu'en France, seulement 1,5 mg/kg de bénomyl est autorisé (tableau 3).

70 mg/kg de biphényle sont autorisés en France. Les Etats-Unis sont plus indulgents et autorisent jusqu'à 110 mg/kg ; par contre, ce même produit est interdit en Espagne (tableau 3).

La législation exprime les résultats des résidus fongicides en mg/kg de fruits entiers, alors que le fongicide n'est contenu finalement que dans la partie externe qui n'est pas consommée.

PAYS	BIPHENYLE	O-PHENYL-PHENOL	THIABENDAZOLE	BENOMYL
W.H.O./FA.O.....	110	10	10 pommes et poires 6 agrumes (10 en 72) 3 bananes 0,4 pulpe des bananes	
BELGIQUE.....	70	12	6 agrumes 3 bananes	
HOLLANDE (1974)....	70	12	6 pommes 10 agrumes 3 bananes	3,5
REPUBLIQUE FEDERALE ALLEMANDE.....	70	12	6 agrumes 3 bananes	10 agrumes 1 pulpe des agrumes 1 bananes 0,2 pulpe des bananes
ANGLETERRE.....	70	12	6 agrumes 3 bananes	
FRANCE.....	70	12	6 agrumes 3 bananes	1,5 agrumes 1 bananes
ETATS-UNIS (1972)..	110	12	2 agrumes 3 bananes 0,4 pulpe des bananes	1 bananes 0,2 pulpe des bananes 15 abricots et pêches
SUISSE.....	70	10	6 agrumes 3 bananes 0,4 pulpe des bananes	7 agrumes 1 pulpe des agrumes 1 bananes 0,6 pulpe des bananes
CANADA.....	110		10 (1974) (229)	
ESPAGNE.....	interdit			
SUEDE.....	70	10	6 agrumes 3 bananes 0,4 pulpe des bananes	
ISRAEL.....			10 agrumes 10 poires	

11. RÉSULTATS D'ENQUÊTES

SUR LES RÉSIDUS DE FONGICIDES

Comme les antifongiques des agrumes font l'objet d'une législation particulière, plusieurs enquêtes ont été menées dans le but de détecter les fraudes qualitatives (produits non autorisés) ou quantitatives (surdosages).

11.1... ECHANTILLONNAGE -

Une méthode a été proposée par DE VOS (56) pour obtenir un bon échantillonnage, à partir des cartons de 40 livres. Dix fruits prélevés au hasard de chaque carton donnent des valeurs avec 10 % de déviation standard.

Sur un carton, une analyse a donné les résultats suivants :

- sur une moitié des fruits :
 - . taux moyen en biphényle..... 47 ppm
- sur l'autre moitié :
 - . taux moyen en biphényle..... 52 ppm

Les valeurs individuelles variaient de 23 à 98 ppm. Selon l'emplacement par couche de fruits dans le carton, les résultats furent, en commençant du haut en bas :

- 48 - 56 - 58 - 57 - 41.

D'autres auteurs recommandent de prélever 20 à 50 fruits par lot : 20 oranges ou pamplemousses ou 30 citrons, pour obtenir un échantillon représentatif (220).

11.2... RESULTATS DES ENQUETES -

11.2.1. FRUITS PRIS AU HASARD -

D'après les résultats du tableau 4, on peut remarquer que 42 % des fruits mis sur le marché sont traités et près de 11 % des fruits ont un taux supérieur au taux légal.

De plus, d'après l'enquête la plus récente (49), les deux surdosages trouvés ne portaient pas la mention "fruits traités".

Mais près de 88,7 % des fruits traités ont des taux largement inférieurs aux doses admises par les circulaires françaises et internationales.

11.2.2. FRUITS TRAITES -

Les enquêtes rapportées dans le tableau 5 montrent que 6,8 % des fruits traités ont un taux dépassant les limites légales et 93,2 % ont un taux inférieur. Mais parmi les fruits déclarés "traités", 92 % renferment des quantités décelables de fongicides.

11.2.3. FREQUENCE DES FONGICIDES -

D'après le tableau (N° 6) 51,6 % des fruits qui se trouvent sur le marché sont traités.

On remarque, de plus, que le biphényle demeure très employé puisque 42,9 % des fruits traités le sont au biphényle, 31 % à l'O-phényl-phénol et 25 % au thiabendazole ; par contre, seulement 5 % des fruits sont traités au bénomyl.

Il faut signaler aussi que 4,8 % des fruits sont traités par deux produits en même temps : le biphényle et l'O-phényl-phénol en général (20) ou O-phényl-phénol et thiabendazole (9).

D'après les résultats donnés par le Laboratoire coopératif, sur 54 échantillons analysés, un seul contenait du bénomyl, 28 du thiabendazole et 21 de l'O-phényl-phénol ; par contre, aucun échantillon ne contenait du biphényle. C'est le thiabendazole qui tend actuellement à supplanter les autres fongicides d'après les nouvelles enquêtes ; mais, dans la majorité des cas, les résidus du thiabendazole sont largement inférieurs aux doses limites (49).

L'étiquetage est souvent défectueux puisque seulement 9 fois sur 54 la mention "traitée" a été signalée. Donc, seulement 16 % des fruits traités sont signalés de façon claire et apparente. Le consommateur est donc très mal informé des traitements subis par les agrumes après récolte.

TABLEAU 4 : RESULTATS DES ENQUETES

REALISEES SUR DES FRUITS PRELEVES AU HASARD

PAYS D'ORIGINE	REFE- RENCE	NOMBRE DE FRUITS PRELEVES	NOMBRE DE FRUITS NON TRAITES	N ^b FRUITS A RESIDUS INFERIEURS AU TAUX LEGAL	N ^b FRUITS A RESIDUS SUPERIEURS AU TAUX LEGAL	NOMBRE DE FRUITS TRAITES
ESPAGNE...	(8bis (9)	30	13	17	0	17
	(77)	11	11	0	0	0
	(49)	17	12	3	2	5
ISRAEL....	(8bis (9)	6	0	6		6
	(77)	15	3	5	7	12
TUNISIE...	(8bis (9)	7	4	3	0	3
MAROC.....	(8bis (9)	11	3	8	0	8
	(77)	6	6			
AFRIQUE DU SUD....	(77)	6	0	4	2	6
ETATS-UNIS	(77)	8	4	4	0	4
	(49)	2	1	1	0	1
HONDURAS..	(77)	3			3	3
ITALIE....	(77)	6	3	2	1	3
	(49)	5	2	3	0	3
MEXIQUE...	(49)	2	0	2	0	2
ALLEMAGNE.	(205)	180	120	60		60
TOTAL.....		315	182	118	15	133

TABLEAU 5 : RESULTATS DES ENQUETES

REALISEES SUR DES FRUITS TRAITES

PAYS D'ORIGINE	REFE- RENCE	NOMBRE DE FRUITS ANALYSES	N ^b FRUITS A RESIDUS INFERIEURS AU TAUX LEGAL	N ^b FRUITS A RESIDUS SUPERIEURS AU TAUX LEGAL	NOMBRE DE FRUITS TRAITES
ISRAEL.....	(20)	8	8	0	8
	(173)	48	30	18	48
	(201)	7	7	0	7
ETATS-UNIS.....	(20)	2	1	1	2
	(173)	534	513	21	534
	(201)	6	6	0	6
CHYPRE.....	(20)	1	0	1	1
	(173)	6	6	0	6
	(201)	1	1	0	1
AFRIQUE DU SUD.....	(173)	42	39	3	42
	(209)	5	3	2	5
BRESIL.....	(173)	13	9	4	13
	(201)	2	2	0	2
ITALIE.....	(173)	32	24	8	32
	(201)	9	8	1	9
JAPON.....	(208)	115	115	0	115
MAROC.....	(20)	2	2	0	2
GRECE.....	(20)	1	1	0	1
ALGERIE.....	(76)	1	1	0	1
ESPAGNE.....	(173)	1	1	0	1
EGYPTE.....	(1)	110	36	0	36
TOTAL.....		946	813	59	872

TABLEAU 6 : FREQUENCE DES FONGICIDES EMPLOYES CES DIX DERNIERES ANNEES

AGRUMES	REFE- RENCE	NOMBRE DE FRUITS ANALYSES	NOMBRE DE FRUITS TRAITES	NOMBRE DE FRUITS DEPASSANT TAUX LEGAL	BIPHENYLE	O-PHENYL- PHENOL	THIABEN- DAZOLE	BENOMYL	ETIQUETAGE
	(8bis (9)	54	50		0	21	28.	1	1 erroné 1 dépasse- ment 0
ORANGES.....	(77) (135) (20) (1) (49) (205)	16 101 8 110 44 76	7 45 8 36 21 27		7 13 6 12 5	32 6 12 6	12 16 15	0 5 1	
CITRONS.....	(135) (20) (77) (49) (205)	92 4 19 16 58	72 4 5 2 19	1	50 4 5 6	22 3 3	10	0 2 0	1 non signalé 4 signalés
PAMPLEMOUSSES	(20) (77) (135) (49) (205)	5 20 59 16 46	5 15 59 4 14		4 15 51 1	4 18 1	10	0 4 2	11 non signa- lés 4 signalés
MANDARINES..	(135) (20) (49)	5 1 16	2 0 4	1	0 0	2 0		0 4	
AGRUMES DIVERS (sans précision	(49)	42	18				15	3	
TOTAL.....		808	417		179	130	106	22	9 sur 54

III. TRAVAUX PERSONNELS

1. RECHERCHE D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE APPLICABLE AUX FONGICIDES D'AGRUMES

1.1... CHOIX D'UN SOLVANT DE MIGRATION AVEC LES ETALONS DE REFERENCE -

Notre but est de trouver un seul solvant de migration pour les quatre fongicides étudiés. Pour cela, nous avons fait migrer les fongicides dans le même solvant de migration ; les R_f obtenus figurent dans le tableau 7.

D'après les résultats de ce tableau, on constate qu'il est très difficile de trouver un seul solvant de migration pour les quatre fongicides. Mais on peut toutefois séparer le BCM et le thiabendazole dans le solvant N° 9 ou N° 10, le biphényle dans le solvant N° 3 et l'O-phényl-phénol dans le solvant N° 26.

1.2... RECHERCHE D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES FONGICIDES EXTRAITS D'AGRUMES -

1.2.1. CAS DU BCM -

- Technique après extraction à froid :

On part de 25 g d'écorces d'oranges que l'on agite pendant 30 minutes avec 100 ml des solvants suivants :

- . acétate d'éthyle, benzène, méthanol, éther éthylique, dichloro-méthane.

Après l'extraction, suivie ou non d'une étape de purification, le solvant est évaporé et l'extrait obtenu est déposé sur une plaque de silica gel GF₂₅₄.

La séparation s'effectue :

- . soit avec un seul solvant de migration ;

- . soit avec deux solvants dont le premier ne déplace pratiquement pas le BCM.

Après localisation sous UV, la tache est éluée dans 5 ml de méthanol et spectrophotométrée entre 250 et 350 nm.

(Les résultats sont consignés sur le tableau 8).

- Technique après extraction à chaud :

On utilise pour cette technique l'appareil de Soxhlet.

On part de 25 g d'écorces d'oranges que l'on extrait par 250 ml des solvants suivants :

- . méthanol, acétate d'éthyle, dichloro-méthane.

Après évaporation du solvant, l'extrait est déposé sur une plaque de silicagel GF₂₅₄, et la migration s'effectue dans un ou deux solvants.

Après localisation sous UV, la tache est éluée et spectrophotométrée entre 250 et 350 nm.

(Les résultats sont consignés sur le tableau 9).

- Discussion :

D'après les résultats obtenus (voir tableaux 8 et 9), nous constatons que le meilleur solvant d'extraction est le dichloro-méthane, à froid et à chaud.

Un solvant de purification (benzène - chloroforme, 50 : 50) permet une meilleure séparation quand on utilise le mélange benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2). Par contre, avec le mélange solvant chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2), cette purification préliminaire n'est pas obligatoire.

1.2.2. CAS DU THIABENDAZOLE -

- Technique après extraction à froid :

On part de 25 g d'écorces d'agrumes, sur lesquels on effectue des ajouts de thiabendazole ; on ajoute 100 ml des solvants suivants :

- . méthanol, acétate d'éthyle.

On agite pendant 30 minutes ; on évapore le solvant et on dépose l'extrait obtenu sur une plaque de silica gel GF₂₅₄.

Après migration et localisation sous UV, la tache est éluée dans 5 ml de méthanol et le spectre est tracé entre 250 et 350 nm.

(Les résultats sont représentés dans le tableau 10).

- Technique après extraction à chaud :

25 g d'écorces d'agrumes sont extraits dans un appareil de Soxhlet, par 250 ml des solvants suivants :

. méthanol, acétate d'éthyle, dichloro-méthane.

Après évaporation du solvant et dépôt de l'extrait sur une plaque de silicagel GF₂₅₄, la migration est effectuée dans un ou deux solvants et la tache localisée sous UV est éluée dans 5 ml de méthanol et photométrée entre 250 et 350 nm.

(Les résultats obtenus sont consignés sur le tableau 10).

- Discussion :

D'après les résultats obtenus, on constate que le thia-bendazole peut être séparé après extraction à froid par le méthanol, ou à chaud par le dichloro-méthane.

Un seul solvant de migration est suffisant pour obtenir une bonne séparation du thiabendazole.

1.2.3. CAS DU BIPHENYLE -

- Technique après extraction à froid :

On part de 25 g d'écorces d'agrumes que l'on agite pendant 30 minutes avec 100 ml des solvants suivants :

. méthanol, acétate d'éthyle, benzène, dichloro-méthane.

Après l'extraction, suivie ou non d'une étape de purification, le solvant est évaporé et l'extrait obtenu est déposé sur une plaque de silicagel GF₂₅₄.

Après migration dans le cyclohexane, la tache localisée sous UV est éluée par 5 ml de méthanol et spectrophotométrée entre 300 et 220 nm.

(Les résultats sont consignés sur le tableau 11).

- Technique après extraction à chaud :

L'extraction de 25 g d'écorces d'agrumes se fait à l'aide de l'appareil de Soxhlet, par 250 ml des solvants suivants :

. hexane, méthanol, acétate d'éthyle, dichloro-méthane.

Le solvant est évaporé sous vide ; 0,5 ml de l'extrait obtenu est déposé sur une plaque de silica gel GF₂₅₄.

Après migration dans le cyclohexane, on élue la tache dans 5 ml de méthanol et on passe le spectre entre 300 et 220 nm.

(Les résultats figurent dans le tableau 11).

- Discussion :

D'après les résultats du tableau 11 - plusieurs méthodes d'extraction permettent de séparer le biphenyle :

- . à froid, en utilisant le benzène, le dichloro-méthane ou l'acétate d'éthyle, suivie d'une purification ;
- . à chaud, en utilisant l'hexane, l'acétate d'éthyle ou le dichloro-méthane.

Mais comme notre but est de trouver un même solvant d'extraction pour les quatre fongicides étudiés, nous adopterons la technique d'extraction par le dichloro-méthane à chaud.

1.2.4. CAS DE L'O-PHENYL-PHENOL -

- Technique après extraction à chaud :

Le seul solvant essayé est le dichloro-méthane.

25 g d'écorces d'agrumes sont extraits par 250 ml de dichloro-méthane dans un appareil de Soxhlet.

Le solvant est évaporé et l'extrait obtenu est déposé sur une plaque de silica gel GF₂₅₄.

La migration s'effectue dans un certain nombre de solvants, après localisation sous UV, la tache est éluée dans 5 ml de méthanol et spectrophotométrée entre 350 et 230 nm.

(Les résultats sont consignés sur le tableau 12).

- Discussion :

Le mélange solvant convenable pour séparer l'O-phényl-phénol est l'éther de pétrole - le méthanol (100 : 7), après extraction par le dichloro-méthane à chaud.

- Essai d'extraction de l'O-phényl-phénate de sodium en solution pure :

Peser 4 mg d'O-phényl-phénol, les dissoudre dans 20 ml d'eau distillée. Ajouter quelques gouttes de soude normale.

Extraire l'O-phényl-phénate de sodium obtenu par 50 ml de dichloro-méthane. Agiter mécaniquement l'ampoule pendant 30 minutes.

Séparer les deux phases et sécher la phase organique par une pincée de sulfate de soude.

Passer le spectre de la phase dichloro-méthane. On obtient un maximum d'absorption à 305 nm. (Le maximum d'absorption de l'O-phényl-phénate dans l'eau distillée se situe à 307 nm).

Le spectre de la phase aqueuse ne donne pas de maximum à 307 nm. Donc, on peut dire que l'extraction a été totale.

Evaporer le dichloro-méthane et déposer 0,5 ml du résidu sur une plaque et faire migrer dans le mélange solvant méthanol - éther de pétrole (7 : 100). On utilise l'O-phényl-phénol comme témoin.

Au niveau de ce témoin, on localise une tache bien nette. On élue et on effectue le spectre, on obtient celui de l'O-phényl-phénol.

Donc, il y a dissociation de l'O-phényl-phénate de sodium en O-phényl-phénol au cours de la migration sur la couche mince de silice.

- Essai d'extraction de l'O-phényl-phénate de sodium à partir d'agrumes :

Prendre 1,6 mg d'O-phényl-phénol dans le méthanol. Ajouter quelques gouttes de soude normale.

Mettre le tout sur 25 g d'écorces et extraire par le dichloro-méthane à chaud dans l'appareil de Soxhlet, pendant une heure.

Evaporer sous vide à 10 ml.

Déposer 0,5 ml sur une plaque et faire migrer dans l'éther de pétrole - méthanol (100 : 7).

On obtient une tache au niveau de l'O-phényl-phénol. Après élution, on effectue le spectre et on choisit la longueur d'onde de 287 nm pour le calcul, le rendement est de 99 %.

TABLEAU 7 : CHOIX D'UN SOLVANT DE MIGRATION AVEC LES ETALONS DE REFERENCE

REF.	N°	SOLVANTS	BCM	THIABEN- DAZOLE	BIPHE- NYLE	O-PHENYL- PHENOL
214	1	Chloroforme - acétone	0,79	0,8	0,96	
191	2	Méthanol - chloroforme	0,92	0,92	0,95	
E.P.	3	Cyclohexane	0	0	0,76	
E.P.	4	Chloroforme - méthanol	1	0,43	1	
E.P.	5	Hexane - acétone	0	0	0,88	
E.P.	6	Benzène - méthanol	0,40	0,38	0,92	
153	7	Chloroforme - méthanol	0,50	0,57	0,97	
E.P.	8	Hexane - acétate d'éthyle - acide acétique	0	0	1	
60-108	9	Benzène - ac. acétique - acétone - eau	0,60	0,28	0,94	
231	10	Chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique -				
		Ethanol - hexane - chloroforme	0,40	0,15	0,96	
E.P.	11	Chloroforme - ac. d'éthyle - méthanol	0	0	0,89	
13	12	Chloroforme - acétone - ac. acétique	0,78	0,85	0,94	
13	13	Benzène - acide acétique	0,82	0,57	1	
13	14	Ether éthyl. - ac. acétique - méthanol	0,24	0,09	0,03	
14	15	Ether diéthylique - méthanol	0	0,72	1	
14	16	Ether de pétrole	0,75	0,75	1	
42	17	Méthanol	0		0,6	0
E.P.	18	Benzène	1		1	
E.P.	19	Chloroforme	0	0		
E.P.	20	Chloroforme - méthanol	0,03	0		0,8
E.P.	21	Chloroforme - ac. d'éthyle- ac. acétique	1			
E.P.	22	Chloroforme - benzène	0,45			
E.P.	23	Dichloro-méthane	0			
95	24	Dichloro-méthane - acétone			1	0,7
E.P.	25	Ether de pétrole - méthanol				0,76
E.P.	26					0,3

E.P. = essai personnel.

TABLEAU 8 : EXTRACTION DU BCM A FROID ET SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

FONGICIDE (μ g)	EXTRACTION	SOLVANT	PURIFICATION	MELANGE SOLVANT POUR C.C.M.	Rf	SEPARATION	SPECTRE OBTENU
BCM 50 μ g	froid	acétate d'éthyle	2 x 20 ml HCl 0,1 N Passer à pH 8, puis extraire par 20 ml d'acé- tate d'éthyle. Evaporer	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (90 : 5 : 5)	0,4	mauvaise	non correct
BCM 250 μ g	froid	benzène		1) benzène - chloroforme (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	bonne	non correct
BCM 250 μ g	froid	acétate d'éthyle		1) benzène - chloroforme (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	mauvaise	non correct
BCM 250 μ g	froid	acétate d'éthyle		1) benzène - chloroforme (50 : 50) 2) chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (90 : 5 : 5)	0 0,4	mauvaise	non correct
BCM 62,50 μ g	froid	méthanol		benzène - acide acétique - acétone - eau - (50 : 20 : 5 : 2)	0,5	mauvaise	non correct
BCM 250 μ g	froid	méthanol	milieu alcalin	benzène - acide acétique - acétone - eau - (50 : 20 : 5 : 2)	0,5	bonne	non correct
BCM 250 μ g	froid	acétate d'éthyle	2 x 10 ml NaOH N 2 x 5 eau distillée Evaporer	1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,5	bonne	assez correct
BCM 250 μ g	froid	éther éthylique		1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	bonne	non correct
BCM 250 μ g	froid	dichloro-méthane		1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	bonne	assez correct
BCM 250 μ g	froid	dichloro-méthane		1) éther - toluène (1 : 3) 2) chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 5)	0,45	bonne	correct
BCM 250 μ g	froid	dichloro-méthane	2 x 20 NaOH N 2 x 5 eau distillée	1) benzène - chloroforme (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	mauvaise	non correct
BCM 250 μ g	froid	dichloro-méthane	2 x 20 NaOH N 2 x 5 eau distillée	acétate d'éthyle	0,8	mauvaise	non correct

TABLEAU 9 : EXTRACTION DU BCM A CHAUD ET SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

FONGICIDE (µg)	EXTRACTION	SOLVANT	SOLVANT DE MIGRATION	Rf	SEPARATION	SPECTRE OBTENU
B C M 250 µg	à chaud	méthanol	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2)	0,4	mauvaise	non correct
B C M 250 µg	à chaud	acétate d'éthyle	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2)	0,4	bonne	assez correct
B C M 250 µg	à chaud	acétate d'éthyle	benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,6	bonne	assez correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0 0,6	bonne	correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) benzène - chloroforme (50 : 50) 2) chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (90 : 5 : 5)	0 0,4	bonne	correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) benzène - méthanol (50 : 10)	0 0,4	mauvaise	non correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) chloroforme - benzène (50 : 50) 2) chloroforme - acétone - acide acétique (5 : 25 : 0,5)	0 0,8	mauvaise	assez correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) CHCl3 - benzène (50 : 50) 2) acétate d'éthyle - méthanol - ammoniac (100 : 25 : 1)	0	mauvaise	assez correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) CHCl3 - benzène (50 : 50) 2) CHCl3 - méthanol (98 : 2)	0 0,5	mauvaise	non correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) CHCl3 - benzène (50 : 50) 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0	très bonne	correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	1) CHCl3 - benzène (50 : 50) 2) CHCl3 - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2)	0 0,40	bonne	correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique (95 : 5 : 2)	0,40	très bonne	correct
B C M 250 µg	à chaud	dichloro-méthane	benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,60	bonne	assez correct

TABLEAU 10 : EXTRACTION ET SEPARATION DU THIABENDAZOLE

FONGICIDE (µg)	EXTRACTION	SOLVANT	PURIFICATION	MELANGE SOLVANT POUR C.C.M.	Rf	SEPARATION	SPECTRE OBTENU
THIABENDAZOLE 62,50 µg	froid	méthanol		benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,28	mauvaise	correct
THIABENDAZOLE 250 µg	froid	acétate d'éthyle	milieu alcalin	benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,28	mauvaise	non correct
THIABENDAZOLE 250 µg	chaud	méthanol		benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,28	mauvaise	non correct
THIABENDAZOLE 250 µg	chaud	acétate d'éthyle		benzène - acide acétique - acétone - eau (50 : 20 : 5 : 2)	0,28	mauvaise	non correct
THIABENDAZOLE 250 µg	chaud	dichloro-méthane		1) chloroforme 2) benzène - acide acétique - acétone - eau (70 : 20 : 10 : 2)	0 0,3	bonne	correct
THIABENDAZOLE 250 µg	chaud	dichloro-méthane		benzène - acide acétique - acétone - eau (70 : 20 : 10 : 2)	0,3	très bonne	correct

TABLEAU 11 : EXTRACTION ET SEPARATION DU BIPHENYLE

FONGICIDE (μg)	EXTRACTION	SOLVANT	PURIFICATION	SOLVANT DE MIGRATION EN C.C.M.	Rf	SEPARATION	SPECTRE OBTENU
BIPHENYLE 62,50 μg	froid	méthanol		cyclohexane	0,7	mauvaise	non correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	acétate d'éthyle		cyclohexane	0,7	mauvaise	non correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	benzène		cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	éther éthylique		cyclohexane	0,7	mauvaise	non correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	dichloro-méthane		cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	dichloro-méthane	2 x 20 ml NaOH N 2 x 5 ml eau distillée	cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	froid	acétate d'éthyle	2 x 10 ml NaOH N 2 x 5 ml eau distillée	cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	chaud	hexane		cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	chaud	méthanol		cyclohexane	0,7	mauvaise	non correct
BIPHENYLE 250 μg	chaud	acétate d'éthyle		cyclohexane	0,7	bonne	correct
BIPHENYLE 250 μg	chaud	dichloro-méthane		cyclohexane	0,7	bonne	correct

TABLEAU 12 : EXTRACTION ET SEPARATION DE L'O-PHENYL-PHENOL

FONGICIDE (μg)	EXTRACTION	SOLVANT	SOLVANT DE MIGRATION EN C.C.M.	Rf	SEPARATION	SPECTRE OBTENU
O.P.P. 250 μg	chaud	dichloro-méthane	dichloro-méthane: - acétone. (95 : 5)	0,76	mauvaise	non correct
O.P.P. 250 μg	chaud	dichloro-méthane	dichloro-méthane	0,7	mauvaise	non correct
O.P.P. 250 μg	chaud	dichloro-méthane	chloroforme	0,8	mauvaise	non correct
O.P.P. 250 μg	chaud	dichloro-méthane	éther de pétrole: - méthanol (95 : 5)	0,25	assez bonne	assez correct
O.P.P. 250 μg	chaud	dichloro-méthane	éther de pétrole (100 : 7) méthanol	0,3	bonne	correct

1.3... TECHNIQUES ADOPTEES -

1.3.1. DOSAGE DU BCM -

- Principe :

Après extraction des écorces d'agrumes par le dichloro-méthane à chaud, on purifie l'extrait obtenu sur couche mince de silicagel GF₂₅₄, et la tache localisée sous lumière ultra-violette est éluée par le méthanol et dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 286 nm.

- Matériels et réactifs :

. Matériels :

- . Appareil de Soxhlet pour l'extraction.
- . Ballon de 500 ml à col rodé.
- . Calotte chauffante.
- . Evaporateur rotatif Vapsilator.
- . Fiole jaugée de 10 ml.
- . Etaleur de couche mince Chemetron.
- . Seringue Hamilton de 50 µl pour déposer les témoins.
- . Plaque de silica gel GF₂₅₄ d'épaisseur 0,5 mm.
- . Cuve de migration.
- . Lampe à UV 254-366 nm.
- . Agitateur mécanique B.T.L.
- . Centrifugeuse.
- . Spectrophotomètre UV Beckman DB-GT avec enregistreur couplé.

. Réactifs :

- . Dichloro-méthane technique.
- . Chloroforme technique.
- . Acétate d'éthyle technique.
- . Acide acétique technique.
- . Méthanol pour analyses.
- . Solutions étalons de BCM dans le méthanol (échantillon fourni par R.P. Phyto-Sanitaire) ; solution mère à 100 mg/l ; dilutions à 2,6 - 5,2 - 7,8 mg/l.

- Technique :

. Préparation de l'échantillon à analyser :

Un lot de fruits voisin d'un kg est épluché et les écorces sont pesées et coupées en lamelles de 1 x 0,5 cm environ dont on prendra 25 g exactement.

On déterminera le rapport $P = \frac{\text{Poids d'écorces séparées}}{\text{Poids des fruits entiers}}$

. Extraction :

Introduire les 25 g d'écorces pesées dans la cartouche de l'appareil de Soxhlet.

Dans un ballon de 500 ml, introduire 250 ml de dichlorométhane. Adapter le ballon à l'appareil, chauffer et maintenir le chauffage une heure à partir du moment de l'ébullition.

Au dernier siphonage, arrêter le chauffage et récupérer dans le ballon les quelques millilitres de solvant qui restent dans la cartouche.

Evaporer sous vide jusqu'à 4 à 5 ml à 50°C

Reprendre l'extrait obtenu dans une fiole jaugée de 10 ml. Ajuster au trait de jauge avec le dichlorométhane utilisé pour rincer le ballon

. Purification de l'extrait :

a) Préparation des plaques :

Peser 50 g de silicagel GF₂₅₄. Les mélanger avec 100 ml d'eau distillée dans un mortier.

Cette quantité suffit pour préparer 5 plaques 20 x 20 cm de 0,5 mm d'épaisseur.

Laisser les plaques sécher 30 minutes au moins, avant de les mettre à l'étuve pendant une heure à 100°C pour les activer.

b) Dépôt de l'extrait :

Sortir les plaques de l'étuve. Laisser refroidir quelques minutes.

En utilisant un étaleur automatique, déposer 0,5 ml de l'extrait sous forme de trait.

Déposer de part et d'autre de l'extrait une solution étalon de BCM (10 µg).

c) Migration de la plaque :

Préparer le solvant de migration suivant :

. chloroforme.....	95
. acétate d'éthyle.....	5
. acide acétique.....	2

Laisser le solvant saturer la cuve.

Introduire la plaque et laisser migrer le solvant sur 15 cm, ce qui demande 45 minutes environ.

Au bout de ce temps, sortir la plaque et sécher complètement.

Sous la lumière ultra-violette, repérer la tache correspondant au témoin de thiabendazole, qui a un Rf de 0,4 environ.

. Dosage spectrophotométrique :a) Elution du BCM :

Une fois la tache repérée, gratter avec une spatule et transvaser la silice dans un tube d'environ 8 ml, rodé, contenant 5 ml de méthanol.

Agiter pendant une heure sur un agitateur mécanique. Centrifuger à 5000 tours pendant 5 minutes.

b) Dosage proprement dit :

Séparer 3 ml du surnageant et tracer le spectre de 350 à 230 nm en utilisant des cuves de quartz d'un centimètre d'épaisseur et du méthanol comme solution de référence.

Le BCM présente deux maxima d'absorption, le premier est situé à 285 nm, le deuxième à 278 nm. On effectuera les dosages à 285 nm (fig. 4).

Tracer les spectres d'absorption des solutions de BCM respectivement à 2,6 - 5,2 - 7,8 mg/l.

Mesurer graphiquement la densité optique du maximum d'absorption à 285 nm. Les densités optiques (D.O.) ainsi mesurées sont proportionnelles aux concentrations en BCM (mg/l).

Tracer la courbe D.O. en fonction de (mg/l). C'est une droite qui passe par l'origine (fig. 5).

Porter la valeur de la D.O. trouvée pour le dosage de BCM sur la courbe d'étalonnage et déterminer ainsi la concentration de thiabendazole en mg/l, soit x .

. Résultats :

Déterminer la concentration de BCM dans les 5 ml de méthanol, soit : $\frac{x \times 5}{1000}$ mg

Concentration de BCM dans l'extrait entier (10 ml) :

$$\frac{x \times 5}{1000} \times 20 = \text{BCM dans 25 g d'écorces,}$$

$$= \text{BCM dans } 25 \times \frac{1}{p} \text{ g de fruit entier.}$$

Le résultat rapporté au fruit entier est donné par :

$$\frac{x \times 5 \times 20}{25/p} \text{ mg/kg de fruit entier.}$$

- Rendement :

. Rendement global :

Pour des ajouts de 0,5 mg de BCM par 25 mg d'écorce d'agrumes, la moyenne des rendements de 11 dosages est de 94,81 %.

Le rendement obtenu pour un ajout de 1 mg par 25 g d'écorces est de 94,3 %.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

94,28 - 88,55 - 94,28 - 91,42 - 94,28 - 97,14 - 91,42 -
100 - 94,28 - 97,28 - 100 - 94,3.

Le rendement moyen est de 94,77 %.

- . Le rendement de l'extraction de la couche mince après migration est égal à 100 %.
- . Le rendement de l'évaporation sous vide est égal à 96,2 %.

- Sensibilité :

Cette technique permet de détecter 3 µg de BCM / 5 ml de méthanol, soit 0,48 mg/kg de fruit entier (en considérant le rapport $\frac{\text{écorces}}{\text{fruit entier}} = \frac{1}{5}$ et en utilisant des cuves de 1 cm).

La densité optique obtenue est de 0,05.

Cette sensibilité peut être multipliée par quatre en utilisant des cuves de 4 cm.

- Reproductibilité :

Pour vérifier la reproductibilité de la méthode de dosage du BCM, nous avons effectué systématiquement des ajouts de l'ordre de 0,5 mg/25 g d'écorces sur le même lot d'oranges.

Sur 11 dosages effectués, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13.

La moyenne des valeurs obtenues est de $3,60 \pm 0,15$ mg/kg.
Le coefficient de variation obtenue est de 4 %.

- Etude de la stabilité du BCM au cours du stockage des agrumes :

Pour faire cette étude, nous avons choisi un lot d'oranges testé non traité que nous avons traité nous-même en le faisant tremper dans une solution aqueuse acidifiée contenant 2 g de BCM par litre.

Les résidus obtenus après ce traitement sont de 27,8 mg/kg de fruit entier.

Nous avons divisé ce lot en trois parties :

- . une partie a été gardée à l'air libre et à la température du laboratoire, les deux autres parties ont été enveloppées dans une feuille d'aluminium et conservées soit au froid, soit à l'obscurité.

Au bout d'un mois, les dosages effectués sur ces trois lots ont montré que les pertes en BCM sur les oranges gardées à l'air libre sont de l'ordre de 58,9 %, les pertes à l'obscurité sont de 74,9 % et les pertes à + 4°C sont de 74,6 %.

Nous pensons qu'en raison de la pourriture trouvée dans les lots conservés à l'obscurité, il y a eu dégradation accélérée.

- Discussion :

D'après les résultats obtenus, nous constatons que cette technique de dosage est sensible puisque nous pouvons détecter des concentrations en BCM de l'ordre de 0,16 ppm en utilisant des cuves de 4 cm ; elle est reproductible puisque le coefficient de variation trouvé est faible (4 %).

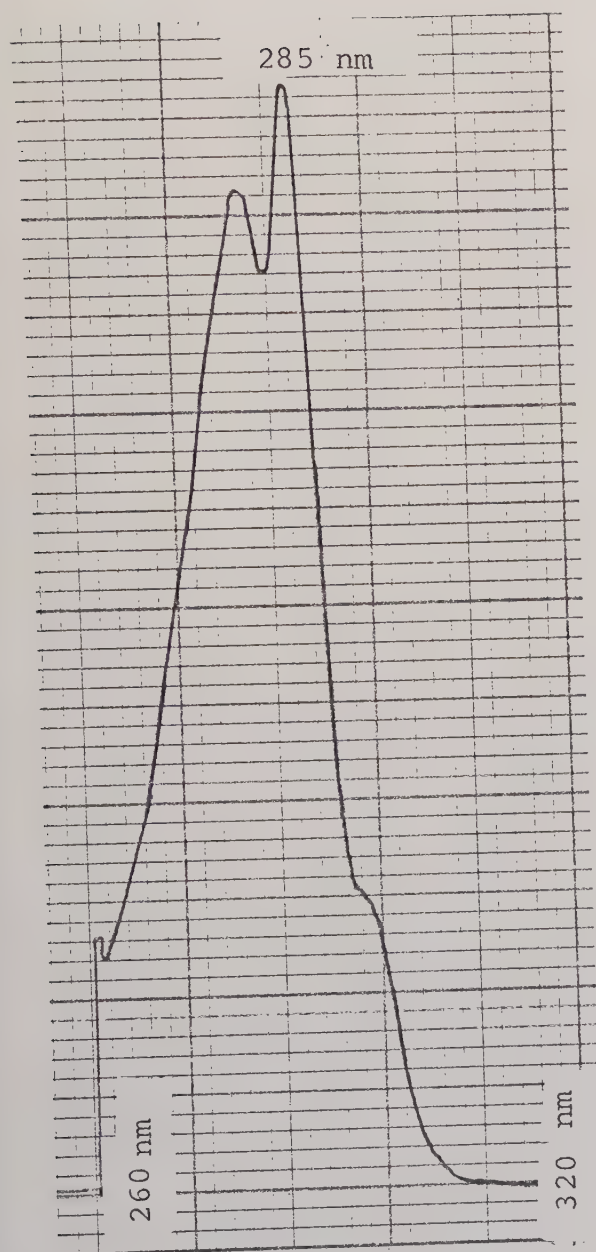
Les causes d'erreur dues aux essences d'agrumes sont minimales puisque le spectre obtenu est pur et le bruit de fond peut être éliminé par soustraction (voir spectre).

C'est une technique assez courte si on la compare à d'autres techniques comportant plusieurs étapes de purification par extraction liquide-liquide.

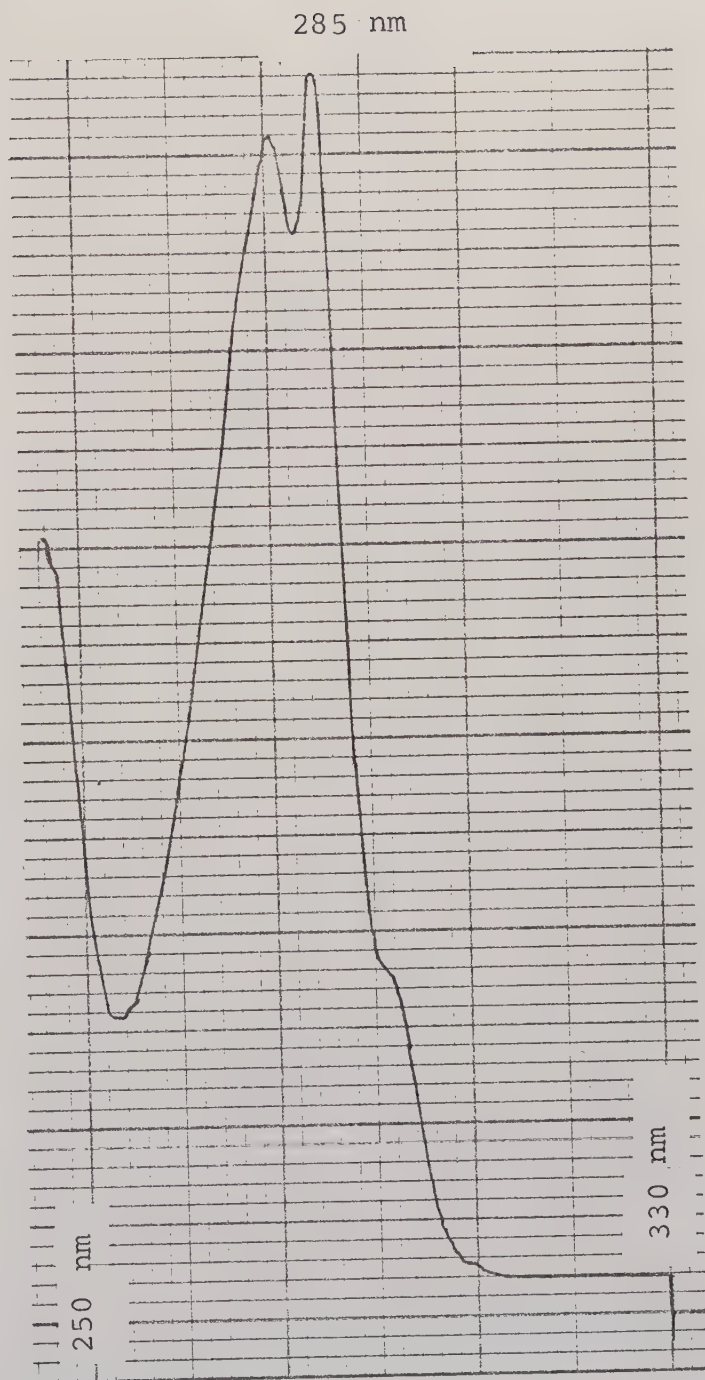
TABEAU 13 : REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE DE DOSAGE DU BCM

ajout : 25 μ g de BCM dans le méthanol
ou 0,5 mg de BCM par 25 g d'écorces.

N°	D.O. (E_1)	CONCENTRATION mg/l	CONCENTRATION mg/kg
1	0,33	4,5	3,6
2	0,31	4,2	3,36
3	0,33	4,5	3,6
4	0,32	4,3	3,44
5	0,33	4,5	3,6
6	0,34	4,6	3,68
7	0,32	4,3	3,44
8	0,35	4,8	3,84
9	0,33	4,5	3,6
10	0,34	4,6	3,68
11	0,35	4,8	3,84



Solution étalon
(39 $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ de méthanol)
soit 7,8 mg/litre



Extrait d'oranges
(42 $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ de méthanol) ·
soit 8,4 mg/litre

Figure 4 : Dosage du BCM
 E_1 (cuve de 1 cm)

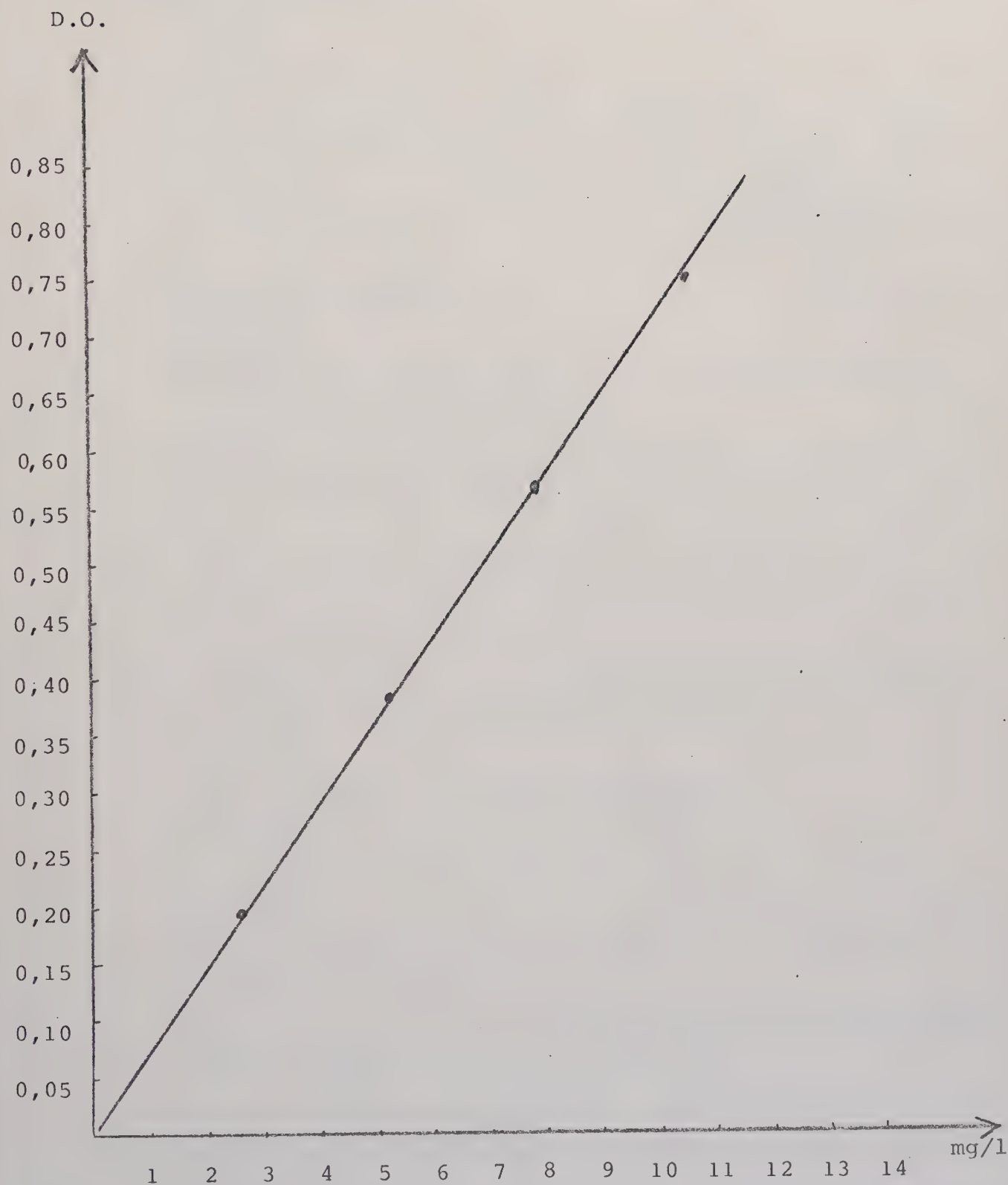


Figure 5 : BCM dans le méthanol
 E_1 (cuve de 1 cm)

1.3.2. DOSAGE DU THIABENDAZOLE -

- Principe :

Après extraction des écorces d'agrumes par le dichloro-méthane à chaud, on purifie l'extrait obtenu sur couche mince de silicagel GF₂₅₄, et la tache localisée sous lumière ultra-violette est éluée par le méthanol et dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 298 nm.

- Matériels et réactifs :

. Matériels :

(cf. BCM).

. Réactifs :

- . Dichloro-méthane technique.
- . Benzène technique.
- . Acide acétique technique.
- . Acétone technique.
- . Méthanol pour analyses.
- . Solutions étalons de thiabendazole dans le méthanol :
solution mère : 100 mg/l - dilutions à 1, 2, 4, 8 mg/l.
(Etalons fournis par Merck-Sharp Dohme).

- Technique :

. Préparation de l'échantillon à analyser :

(cf. BCM).

. Extraction :

Introduire les 25 g d'écorces pesés dans la cartouche de l'appareil de Soxhlet.

Dans un ballon de 500 ml, on introduit 250 ml de dichloro-méthane suivant la technique de HEY (92).

Adapter le ballon à l'appareil, chauffer et maintenir le chauffage une heure à partir du moment de l'ébullition.

Au dernier siphonage, arrêter le chauffage et récupérer dans le ballon les quelques millilitres de solvant qui restent dans la cartouche.

Evaporer sous vide jusqu'à 4 à 5 ml à 50°C. Reprendre l'extrait obtenu dans une fiole jaugée de 10 ml. Ajuster au trait de jauge avec le dichloro-méthane utilisé pour rincer le ballon.

. Purification de l'extrait :

(cf BCM).

. Dépôt de l'extrait :

Sortir les plaques de l'étuve. Laisser refroidir quelques minutes.

En utilisant un étaleur automatique, déposer 0,5 ml de l'extrait sous forme de trait.

Déposer de part et d'autre de l'extrait une solution étalon de thiabendazole (10 µg).

. Migration de la plaque :

Préparer le solvant de migration (suiyant HEY) (92) :

. benzène.....	70
. acide acétique.....	20
. acétone.....	10
. eau.....	2

Laisser le solvant saturer la cuve.

Introduire la plaque et laisser migrer le solvant sur 15 cm, ce qui demande 30 à 45 minutes.

Au bout de ce temps, sortir la plaque et sécher complètement pour éliminer toute trace de benzène.

Sous la lumière ultra-violette, repérer la tache correspondant au témoin de thiabendazole.

$R_f = 0,4$. Une seule migration nous a donné un résultat satisfaisant, sans utiliser un solvant de purification comme l'a fait HEY (92).

. Dosage spectrophotométrique :

a) Elution du thiabendazole :

(cf. BCM).

b) Dosage proprement dit :

Séparer 3 ml du surnageant et tracer le spectre de 350 à 230 nm en utilisant des cuves de quartz d'un centimètre d'épaisseur et du méthanol comme solution de référence.

Tracer les spectres d'absorption des solutions de thiabendazole respectivement à 1, 2, 4 et 8 mg/l dans le méthanol.

Mesurer graphiquement la densité optique du maximum d'absorption à 298 nm (fig. 6).

Les densités optiques (D.O.) ainsi mesurées sont proportionnelles aux concentrations en thiabendazole : mg/l.

Tracer la courbe : D.O. en fonction de la concentration en mg/l. C'est une droite qui passe par l'origine (fig. 7).

Porter la valeur de la D.O. trouvée pour le dosage du thiabendazole sur la courbe d'étalonnage et déterminer ainsi la concentration du thiabendazole en mg/l, soit x .

. Résultats :

Déterminer la concentration en thiabendazole dans les
5 ml de méthanol, soit : $\frac{x \times 5}{1000}$ mg

Concentration en thiabendazole dans l'extrait entier
(10 ml) :

$$\frac{x \times 5}{1000} \times 20 = \text{thiabendazole dans 25 g d'écorces.}$$

$$= \text{thiabendazole dans } 25 \times \frac{1}{P} \text{ g de fruit entier.}$$

Le résultat rapporté au fruit entier est donné par :

$$\frac{x \times 5 \times 20}{25/P} \text{ mg/kg de fruit entier.}$$

- Rendement :

. Rendement global :

Le rendement obtenu pour des ajouts de 0,5 mg de thiabendazole par 25 g d'écorces d'oranges est voisin de 93 %, variant de 88,3 % à 105 %.

C'est la moyenne des rendements de 8 dosages qui sont :

93,22 - 94,91 - 105,08 - 96,61 - 88,13 - 91,52 -
84,74 - 89,83.

. Le rendement de l'extraction de la couche mince après migration est égal à 97 %.

. Le rendement obtenu après évaporation sous vide est voisin de 95 %.

- Sensibilité :

Cette technique permet de détecter jusqu'à 3 µg de thiabendazole par 5 ml de méthanol, soit 0,48 mg/kg de fruit entier.

La D.O. obtenue est égale à 0,07 en utilisant des cuves de 1 cm.

Cette sensibilité est multipliée par 4 si on utilise des cuves de 4 cm pour faire le dosage.

- Reproductibilité :

Nous avons effectué des ajouts de 0,5 mg de thiabendazole par 25 g d'écorces d'oranges du même lot. Le dosage a été répété 8 fois, les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 14, en considérant le rapport :

$$P = \frac{\text{Poids des écorces}}{\text{Poids total}}, \text{ qui est égal à } \frac{1}{5}.$$

La moyenne des 8 dosages obtenue est de $3,53 \pm 0,24$ mg/kg, le coefficient de variation est de 6 %.

- Etude de la stabilité du thiabendazole :

Un lot d'oranges de 2 kg environ a été traité par trempage dans un bain de thiabendazole à 2 g/l. Les résidus obtenus sont de 18,8 mg/kg. Ce lot est divisé en trois parties :

- . une partie est mise à l'air libre et à la température ambiante, les deux autres parties sont enveloppées dans des feuilles d'aluminium et conservées soit à l'obscurité, soit à + 4°C.

Au bout d'un mois, les dosages effectués sur les trois lots ont donné les résultats suivants :

- . à l'air libre, on constate qu'il y a 33,8 % des pertes en thiabendazole ;
- . à l'obscurité, les pertes sont de 72,8 %, nous pensons qu'en raison de la pourriture trouvée, il y a eu dégradation accélérée ;
- . par contre, à + 4°C, aucune perte n'a été signalée, ce qui prouve que le thiabendazole est stable par conservation à froid.

- Discussion :

La technique de dosage du thiabendazole est sensible et reproductible. Elle donne à peu près les mêmes résultats que la technique initiale (technique de HEY, 92) tout en étant plus courte, parce que nous avons constaté qu'un chauffage d'une heure est largement suffisant pour extraire le thiabendazole (par contre, l'auteur HEY effectue un chauffage de 3 heures).

De même, la migration directe dans le solvant, sans purification par le chloroforme (qui constitue une étape supplémentaire et inutile) donne un spectre suffisamment pur pour interpréter les résultats.

Le temps d'agitation a été encore réduit à une heure (2 heures dans la technique de HEY) parce que nous avons constaté, après plusieurs essais, que la quantité de thiabendazole extraite à partir de la silice au bout d'une heure est la même que celle extraite au bout de 2 heures.

TABLEAU 14 : REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE
DE DOSAGE DU THIABENDAZOLE

Ajout : 25 µg/5 ml de méthanol
 ou 0,5 mg par 25 g d'écorces - $R = \frac{1}{5}$

N°	D.O. (E_1)	CONCENTRATION mg/ml	CONCENTRATION mg/kg
1	0,55	4,45	3,56
2	0,56	4,5	3,6
3	0,62	5	4
4	0,57	4,6	3,68
5	0,52	4,2	3,36
6	0,54	4,35	3,48
7	0,50	4	3,2
8	0,53	4,25	3,4

Extrait d'oranges
(23 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ de méthanol)
soit 4,6 mg/litre

Solution étalon
(22 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ de méthanol)
soit 4,4 mg/litre

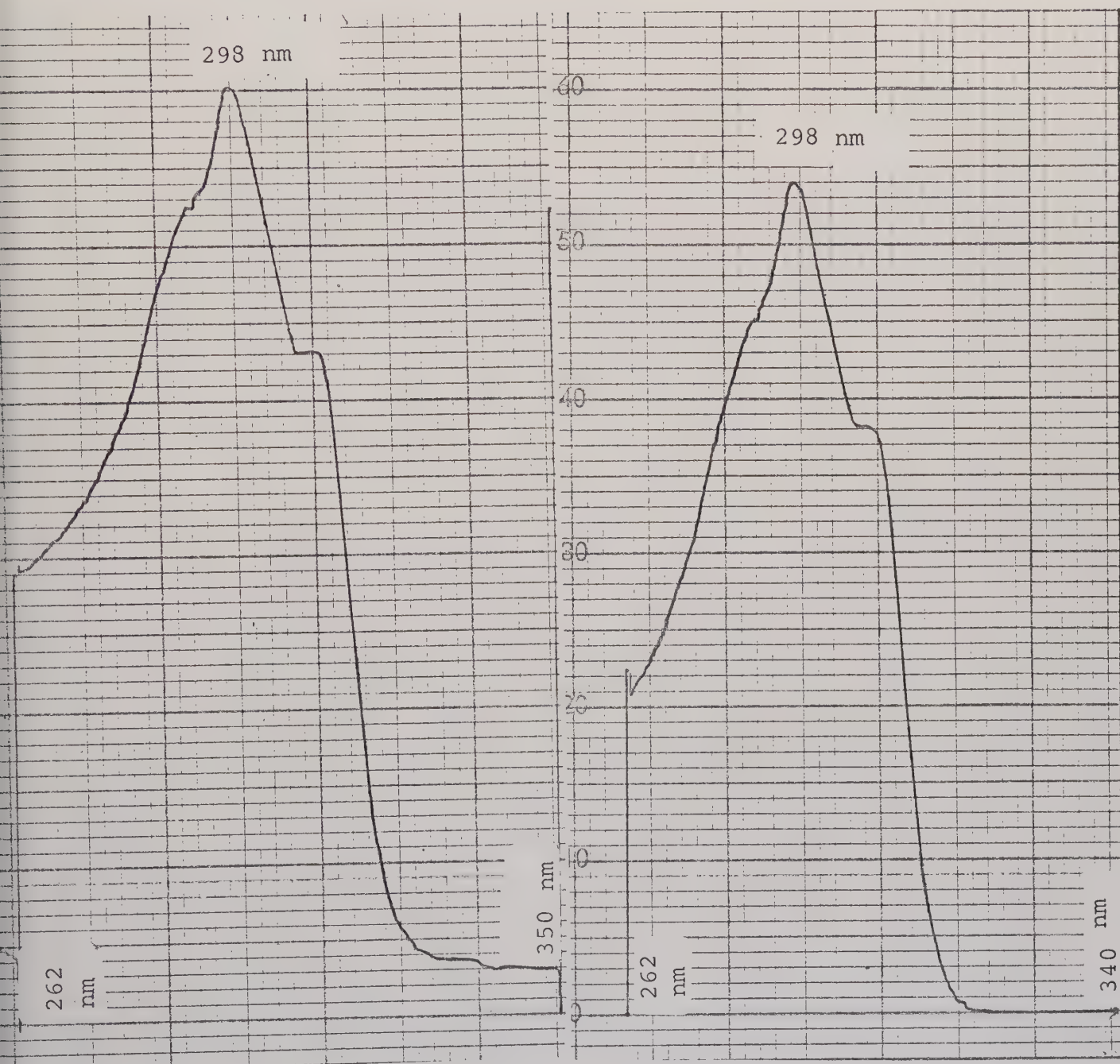


Figure 6 : Dosage du thiabendazole
 E_1 (cuve de 1 cm)

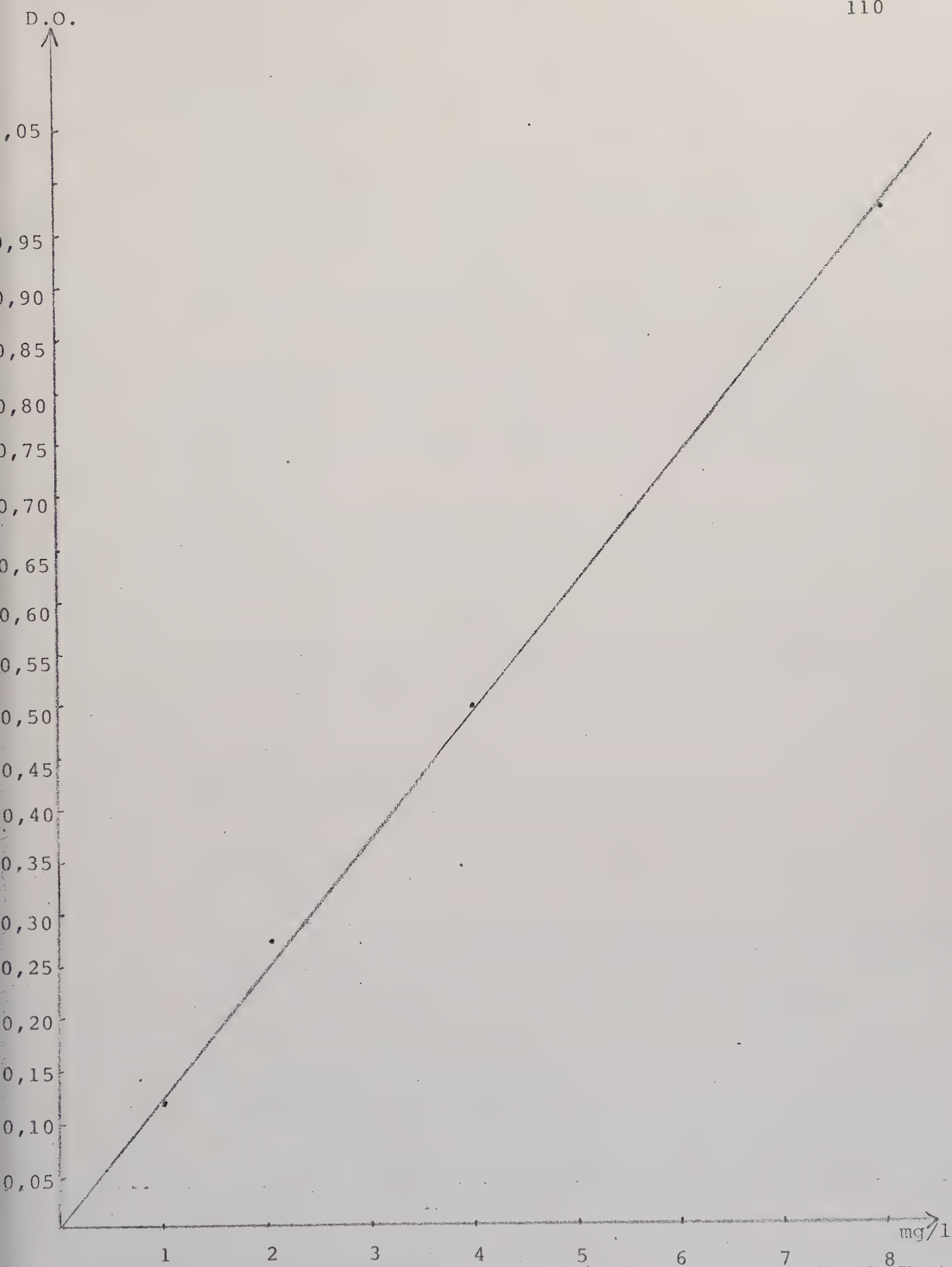


Figure 7 : Thiabendazole dans le méthanol

E_1 (cuve de 1 cm)

1.3.3. DOSAGE DU BIPHENYLE -

- Principe :

Après extraction des écorces d'agrumes par le dichloro-méthane à chaud, on purifie l'extrait obtenu sur couche mince de silicagel GF₂₅₄, et la tache localisée sous lumière ultra-violette est éluée par le méthanol et dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 248 nm.

- Matériels et réactifs :

. Matériels :

(cf. BCM).

. Réactifs :

- . Dichloro-méthane technique.
- . Cyclohexane technique.
- . Méthanol pour analyses.
- . Solutions étalons dans le méthanol : solution mère de biphényle Prolabo à 1 g/l - solutions diluées à 1, 2, 4, 9 et 10 mg/l.

- Technique :

. Préparation de l'échantillon à analyser :

(cf. BCM).

. Extraction :

(cf. BCM).

Nous avons adopté l'extraction du biphényle par le dichloro-méthane selon SPERLICH, HOPE et REINHARD (95, 181, 206), mais à chaud, en utilisant un appareil de Soxhlet.

. Purification de l'extrait :

a) Préparation des plaques :

(cf. BCM).

(Même technique que pour les autres fongicides).

b) Dépôt de l'extrait :

Déposer 0,5 ml sous forme de trait comme il est indiqué pour les autres fongicides.

Utiliser comme témoin 10 µg de biphényle déposés de part et d'autre du trait.

c) Migration de la plaque :

Utiliser le cyclohexane comme solvant de migration.

Saturer la cuve avant de mettre la plaque. Laisser migrer le solvant sur 15 cm, ce qui demande 45 minutes.

Au bout de ce temps, sortir la plaque et la sécher complètement.

Sous la lumière ultra-violette, repérer la tache correspondant au témoin de biphényle.

$$R_f = 0,7$$

. Dosage spectrophotométrique :a) Elution du biphényle :

(cf BCM).

b) Dosage proprement dit :

Séparer 3 ml du surnageant et tracer le spectre de 300 à 220 nm en utilisant des cuves de quartz d'un centimètre d'épaisseur et du méthanol comme solution de référence (fig. 8).

Tracer les spectres d'absorption des solutions de biphényle respectivement à 1, 2, 4, 9 et 10 mg/l (fig. 9).

Mesurer graphiquement la densité optique (D.O.) du maximum d'absorption à 248 nm.

Tracer la courbe D.O. en fonction de la concentration en biphényle en mg/l. C'est une droite qui passe par l'origine.

Porter la valeur de la D.O. trouvée pour le dosage du biphényle sur la courbe d'étalonnage et déterminer ainsi la concentration de biphényle en mg/l, soit x .

. Résultats :

La concentration du biphényle dans les 5 ml de méthanol =

$$\frac{x \times 5}{1000} \text{ mg.}$$

La concentration du biphényle dans l'extrait entier (10 ml)=

$$\frac{x \times 5}{1000} \times 20 = \text{biphényle dans 25 g d'écorces}$$

 ou $25 \times \frac{1}{P} \text{ g de fruit entier.}$

Le résultat rapporté au fruit entier est donné par :

$$\frac{x \times 5 \times 20}{25/P} \text{ mg/kg de fruit entier.}$$

- Rendement :

. Rendement global :

Pour un ajout de 1 mg de biphényle sur 25 g d'écorces, le rendement obtenu est de 91,5 %.

Pour un ajout de 0,456 mg, le rendement est de 96,05 %
 et pour un ajout de 1,4 mg, le rendement est de 90,71 %.

Le rendement moyen est de 92,75 %.

. Le rendement de l'extraction de la couche mince après migration est égal à 98 %.

. Le rendement de l'évaporation sous vide est de 95 %.

- Sensibilité :

Cette technique permet de détecter 3 µg de biphényle par 5 ml de méthanol, soit 0,48 mg/kg de fruit entier, la D.O. étant de 0,08, pour des cuves de 1 cm.

Cette sensibilité peut être augmentée 4 fois en utilisant des cuves de 4 cm.

- Reproductibilité :

Nous avons effectué des ajouts de 0,5 mg de biphényle par 25 g d'écorces d'un même lot d'oranges. Le dosage a été répété 8 fois et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 15.

La moyenne des résultats est de $5,46 \pm 0,28$ mg/kg de fruit entier.

Le coefficient de variation est de 5 %.

- Etude de la stabilité du biphényle :

Pour traiter un lot d'oranges, nous avons trempé des papiers très fins dans une solution méthanolique de biphényle. Ces papiers ont servi à envelopper les oranges. Au bout de 24 heures, nous avons effectué un dosage des résidus de biphényle sur les écorces et nous avons trouvé 28,57 mg/kg de fruit entier.

Nous avons divisé les oranges ainsi traitées en trois lots :

- . un lot a été conservé à $+ 4^{\circ}\text{C}$;
- . un lot à l'obscurité ;
- . et le troisième lot a été laissé à l'air libre et à la température du laboratoire.

Au bout d'un mois, les dosages effectués sur ces trois lots ont montré que :

- . à $+ 4^{\circ}\text{C}$ les pertes sont de 54,3 % ;
- . à l'obscurité, elles sont de 78,6 % ;
- . par contre, à l'air libre, les pertes sont de 91,25 % vu la volatilité du biphényle.

- Discussion :

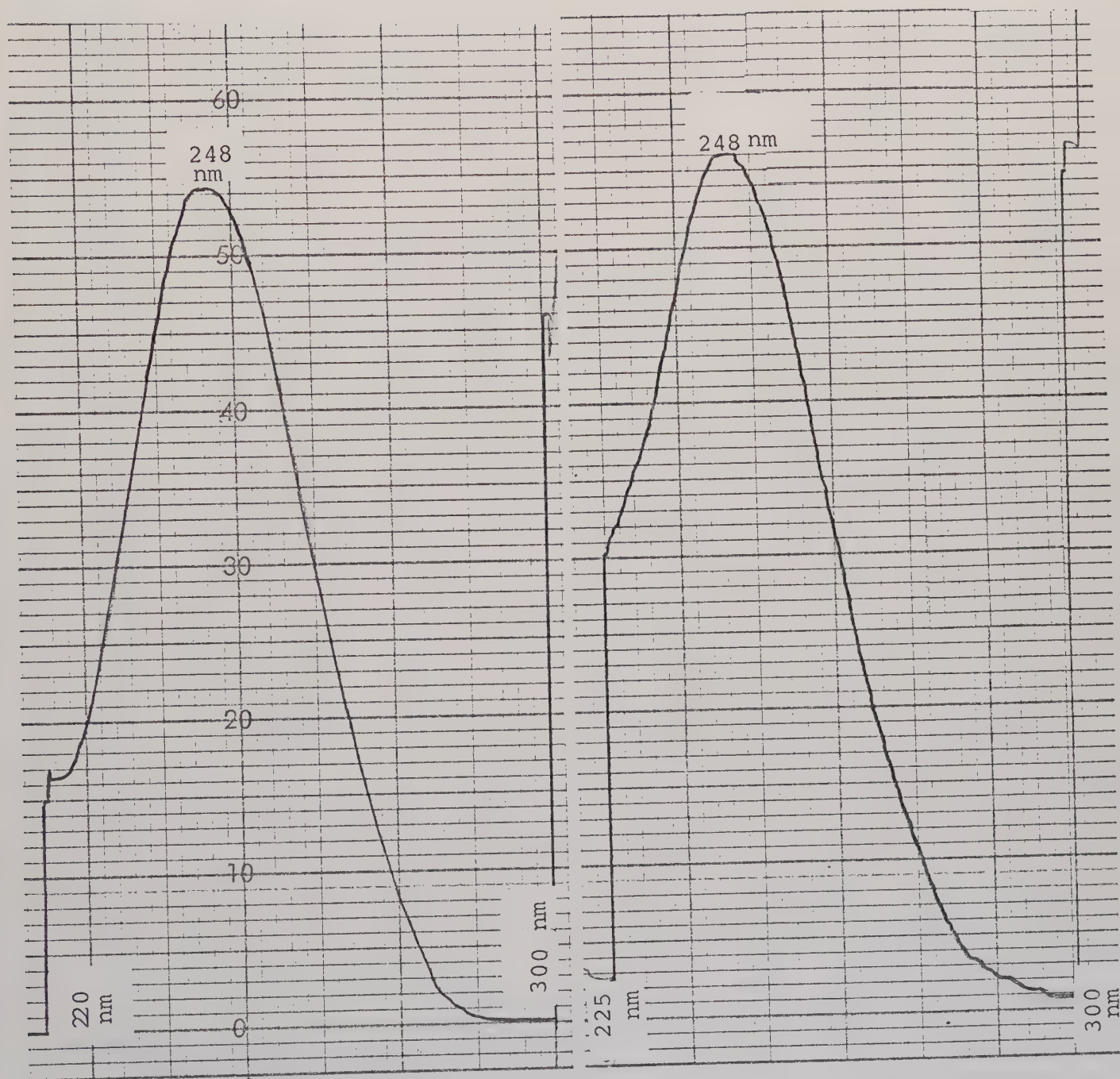
Cette technique a été appliquée par plusieurs auteurs mais en utilisant d'autres solvants d'extraction et de migration (42, 43).

Elle est simple et permet de détecter des quantités infimes de biphényle (1 $\mu\text{g}/5$ ml en utilisant des cuves de 4 cm). C'est une technique reproductible (coefficient de variation de 5 %), elle est rapide et permet d'effectuer des dosages en série.

TABLEAU 15 : REPRODUCTIBILITE DU DOSAGE DU BIPHENYLE

Ajout : 25 μ g/5 ml de méthanol
ou 0,5 mg de biphényle/25 g d'écorces

N°	D.O. (E_1 1 cm)	CONCENTRATION mg/l	CONCENTRATION mg/kg
1	0,73	6,6	5,28
2	0,75	6,8	5,44
3	0,83	7,5	6
4	0,79	7,1	5,68
5	0,69	6,3	5,04
6	0,76	6,9	5,52
7	0,74	6,7	5,36
8	0,74	6,7	5,36



Solution étalon
(24,5 μg /5 ml de méthanol)
soit 4,9 mg/litre

Extrait d'oranges
(25 μg /5 ml de méthanol)
soit 5 mg/litre

Figure 8 : Dosage du biphényle
 E_1 (cuve de 1 cm)

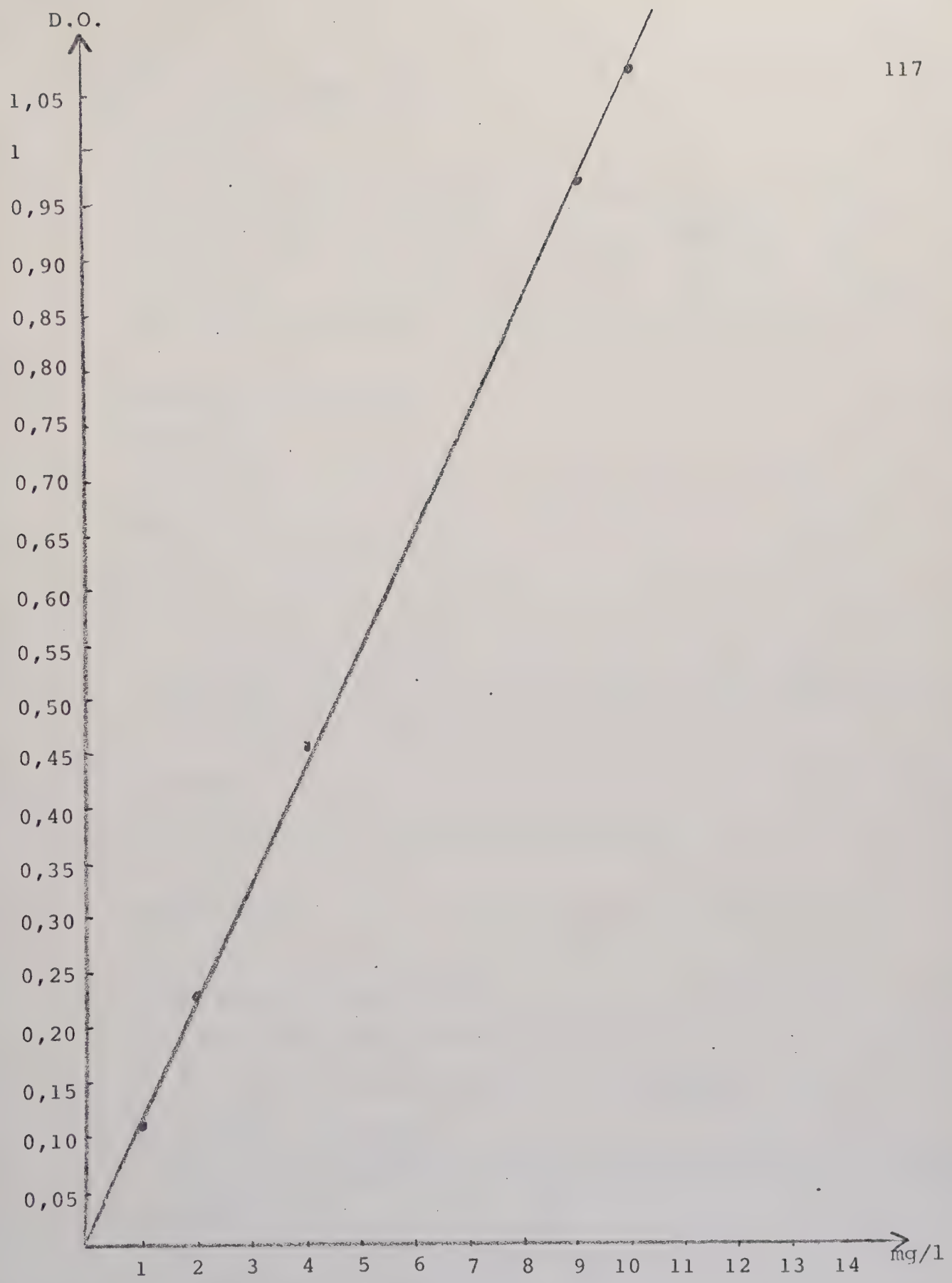


Figure 9 : Biphényle dans le méthanol
 E_1 (cuve de 1 cm)

1.3.4. DOSAGE DE L'O-PHENYL-PHENOL -

- Principe :

Après extraction des écorces d'agrumes par le dichloro-méthane à chaud, on purifie l'extrait obtenu sur couche mince de silicagel GF₂₅₄, et la tache localisée sous lumière ultra-violette est éluée par le méthanol et dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 287 nm.

- Matériels et réactifs :

. Matériels :

. (cf. BCM).

. Réactifs :

. Dichloro-méthane technique.

. Ether de pétrole technique.

. Méthanol pour analyses.

. Solutions étalons dans le méthanol : solution mère d'O-phényl-phénol (Aldrich) à 0,8 g/l - dilutions à 2, 4, 6 et 8 mg/l.

- Technique :

. Préparation de l'échantillon à analyser :

(cf. BCM).

. Extraction :

(cf. BCM).

. Purification de l'extrait :

a) Préparation des plaques :

(cf. BCM, id. thiabendazole et biphényle).

b) Dépôt de l'extrait :

Sortir les plaques de l'étuve. Laisser refroidir quelques minutes.

En utilisant un étaleur automatique, déposer 0,5 ml de l'extrait sous forme de trait.

Déposer de part et d'autre de l'extrait une solution étalon d'O-phényl-phénol (10 µg).

c) Migration de la plaque :

Préparer le solvant de migration suivant :

- . éther de pétrole..... 100
- . méthanol..... 7

Laisser le solvant saturer la cuve.

Introduire la plaque et laisser migrer le solvant sur 15 cm, ce qui demande 30 à 45 minutes.

Au bout de ce temps, sortir la plaque et sécher complètement.

Sous la lumière ultra-violette, repérer la tache correspondant au témoin d'O-phényl-phénol qui a un Rf de 0,3.

. Dosage spectrophotométrique :

a) Elution de l'O-phényl-phénol :

(cf. BCM).

b) Dosage proprement dit :

Séparer 3 ml du surnageant et tracer le spectre de 350 à 230 nm en utilisant des cuves de quartz d'un centimètre d'épaisseur et du méthanol comme solution de référence.

Tracer les spectres d'absorption des solutions d'O-phényl-phénol respectivement à 2, 4, 6 et 8 mg/l.

L'O-phényl-phénol présente deux pics d'absorption :

- . le premier est situé à 287,5 nm ;
- . le deuxième, plus important, est situé à 246 nm (fig. 10).

Mesurer graphiquement la densité optique (D.O.) du maximum d'absorption à 287,5 nm ou à 246.

Tracer l'une des deux courbes suivantes :

- . l'une représente la D.O. à 287,5 nm en fonction de la concentration (fig. 11) ;
- . l'autre représente la D.O. à 246 nm en fonction de la concentration (fig. 12).

Dans les deux cas, c'est une droite qui passe par l'origine.

Porter la valeur de la D.O. trouvée pour le dosage d'O-phényl-phénol sur la courbe d'étalonnage et déterminer ainsi la concentration en mg/l, soit x .

. Résultats :

Déterminer la concentration d'O-phényl-phénol dans les 5 ml de méthanol, soit : $\frac{x \times 5}{1000}$ mg

Concentration d'O-phényl-phénol dans l'extrait entier (10 ml) :

$$\frac{x \times 5}{1000} \times 20 = \text{O-phényl-phénol dans 25 g d'écorces,}$$

$$= \text{O-phényl-phénol dans } 25 \times \frac{1}{P} \text{ g de fruit entier.}$$

Le résultat rapporté au fruit entier est donné par :

$$\frac{x \times 5 \times 20}{25/P} \text{ mg/kg de fruit entier.}$$

- Rendement :

. Rendement global :

Le rendement moyen pour des ajouts de 1,6 mg d'O-phényl-phénol par 25 g d'écorces réalisés sur 8 dosages est de 92,96 %, allant de 87,5 à 100 %.

Les rendements obtenus pour les 8 dosages sont :

$$97,91 - 91,66 - 100 - 87,5 - 91,66 - 87,5 - 100 - 87,5.$$

. Le rendement de l'extraction de la couche mince après migration est de 100 %.

. Le rendement de l'évaporation sous vide est de 98 %.

- Sensibilité :

Cette technique permet de détecter 3 µg d'O-phényl-phénol par 5 ml de méthanol en utilisant des cuves de 1 cm (soit 0,48 mg/kg de fruit entier) et en faisant la lecture à 246 nm. La densité optique est de 0,06.

Par contre, si la lecture se fait à 287 nm, la limite de détection est de 6 µg/5 ml, soit 0,9 mg/kg de fruit entier. La D.O. est de 0,05.

Dans les deux cas, la sensibilité est multipliée par 4 si on utilise des cuves de 4 cm pour faire les dosages.

- Reproductibilité :

Nous avons effectué des ajouts de 1,6 mg d'O-phényl-phénol par 25 g d'écorces. Les dosages répétés 8 fois sont représentés dans le tableau 16.

La moyenne obtenue est de $11,80 \pm 0,70$ mg/kg de fruit entier.

Le coefficient de variation est de 5 %.

- Discussion :

Cette technique permet en même temps de doser l'O-phényl-phénate de sodium. Nous avons réalisé cette technique en faisant des ajouts d'O-phényl-phénate de sodium.

Après migration sur couche mince dans le solvant : éther de pétrole - méthanol (100 : 7), nous avons repéré une tache correspondant au témoin de l'O-phényl-phénol.

Donc, on peut supposer que l'ortho-phényl-phénate libère l'O-phényl-phénol par migration sur la silice.

Le rendement de ce dosage est de 99 %.

Cette technique est sensible, reproductible et assez rapide.

TABLEAU 16 : REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE
DE DOSAGE DE L'O-PHENYL-PHENOL

Ajout : 80 µg/5 ml de méthanol
ou 1,6 mg/25 g d'écorces

N°	D.O. (E_1 1cm)	CONCENTRATION mg/l	CONCENTRATION mg/kg
1	0,47	15,5	12,4
2	0,44	14,5	11,6
3	0,48	15,9	12,72
4	0,42	13,9	11,12
5	0,44	14,5	11,6
6	0,42	13,9	11,12
7	0,48	15,9	12,72
8	0,42	13,9	11,12

Solution étalon
(40 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ de méthanol)
soit 8 mg/litre

Extrait d'oranges
(31,5 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ de méthanol)
soit 7,3 mg/litre

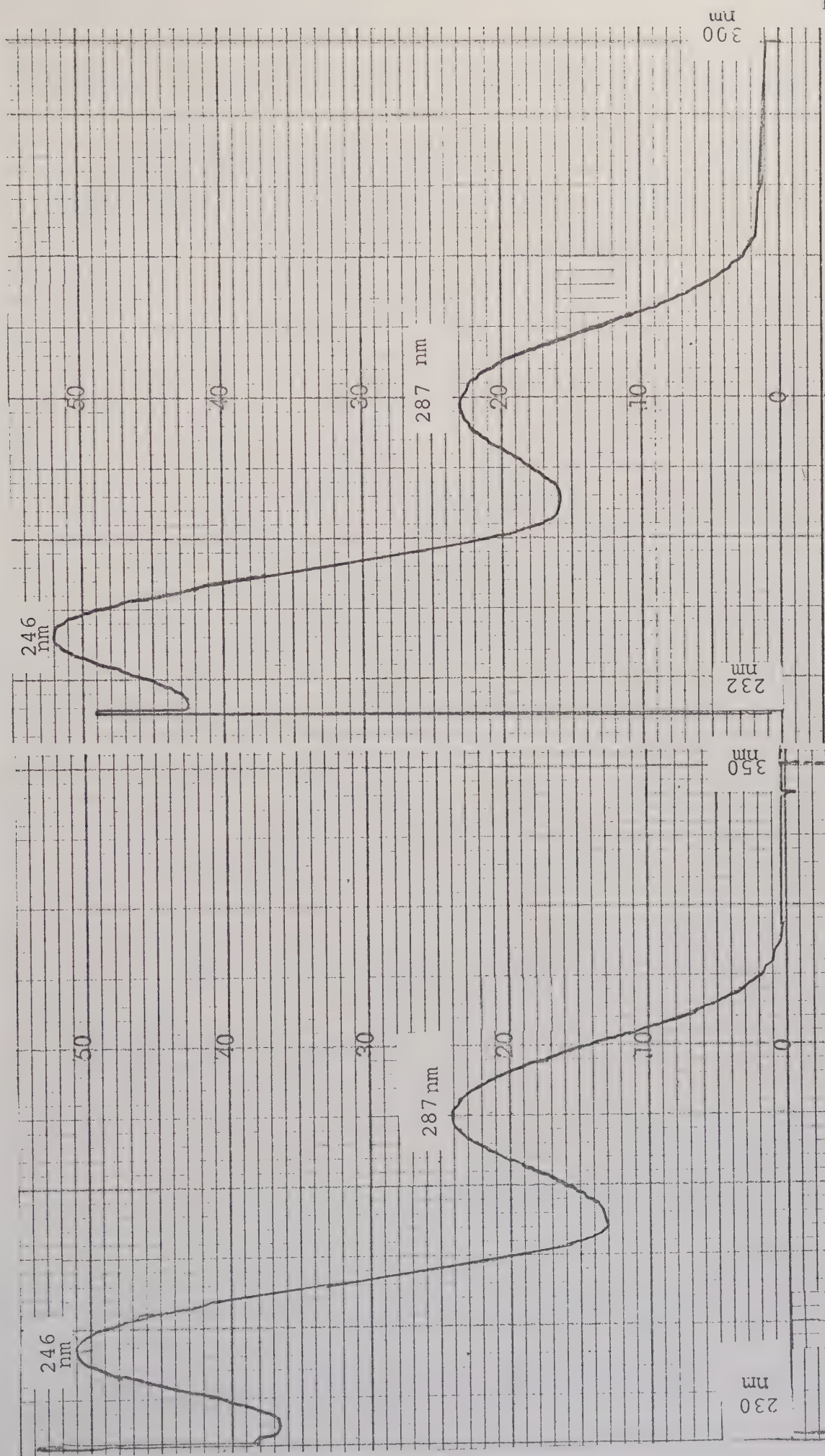


Figure 10 : Dosage de 1'-O-phényl-phénol
 E_1 (cuve de 1 cm) à 287 nm

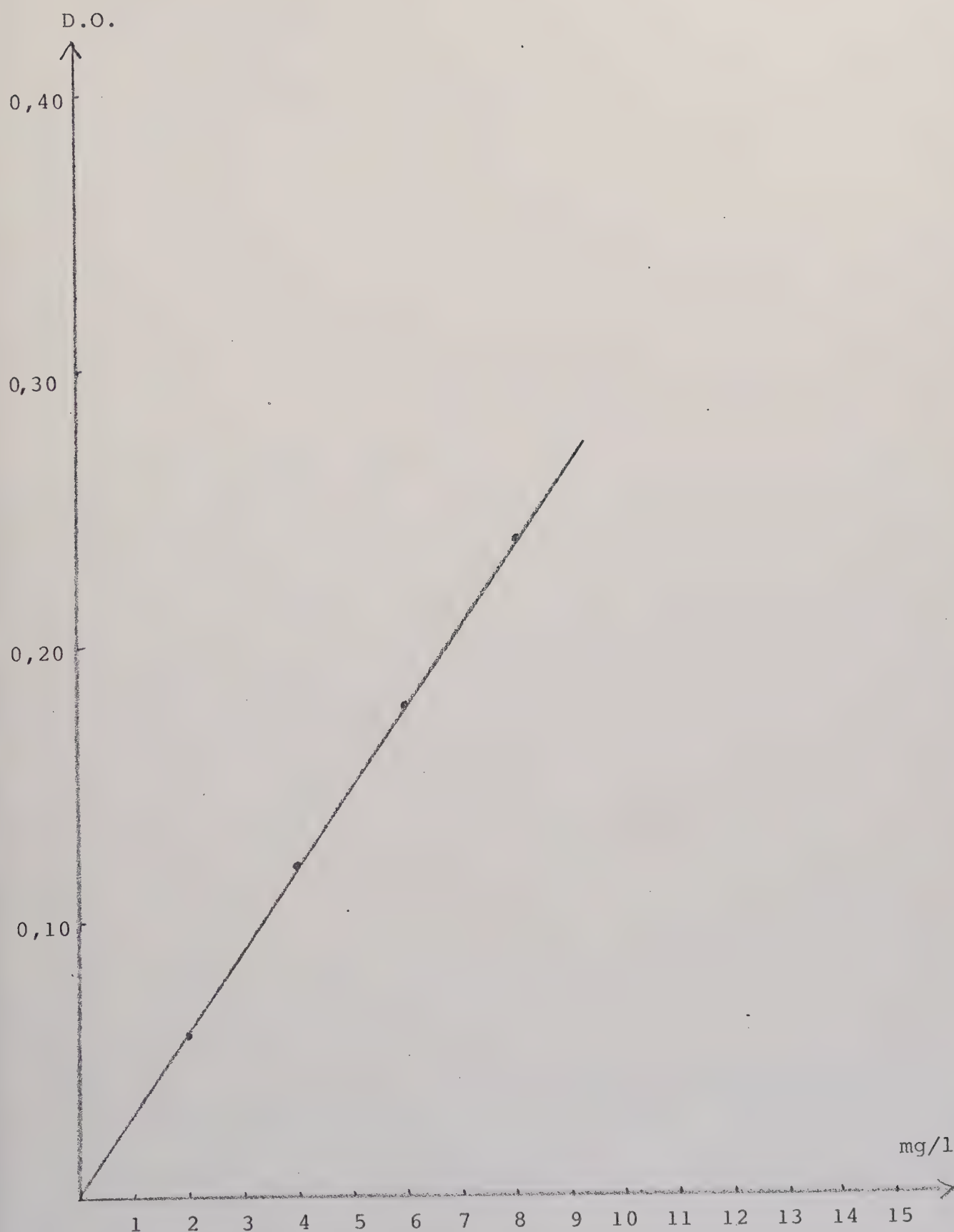


Figure 11 : O-phényl-phénol dans le méthanol à 287 nm
 E_1 (cuve de 1 cm)

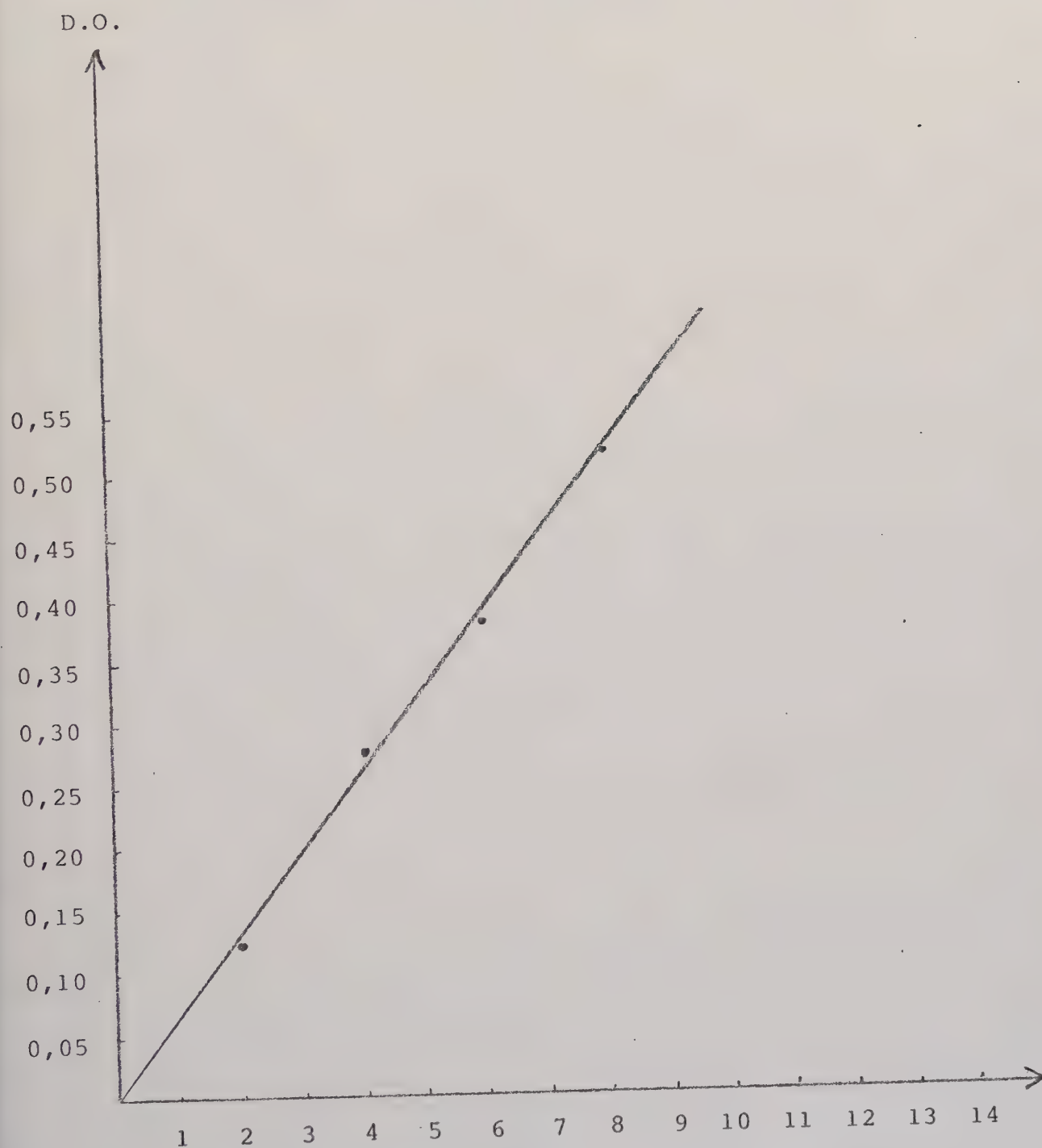


Figure 12 : O-phényl-phénol dans le méthanol à 246 nm
 E_1 (cuve de 1 cm)

1.4... SCHEMA GENERAL -

Nous avons fait figurer la technique commune de dosage du BCM, thiabendazole, biphényle et O-phényl-phénol, sous forme d'un schéma simplifié (fig. 13).

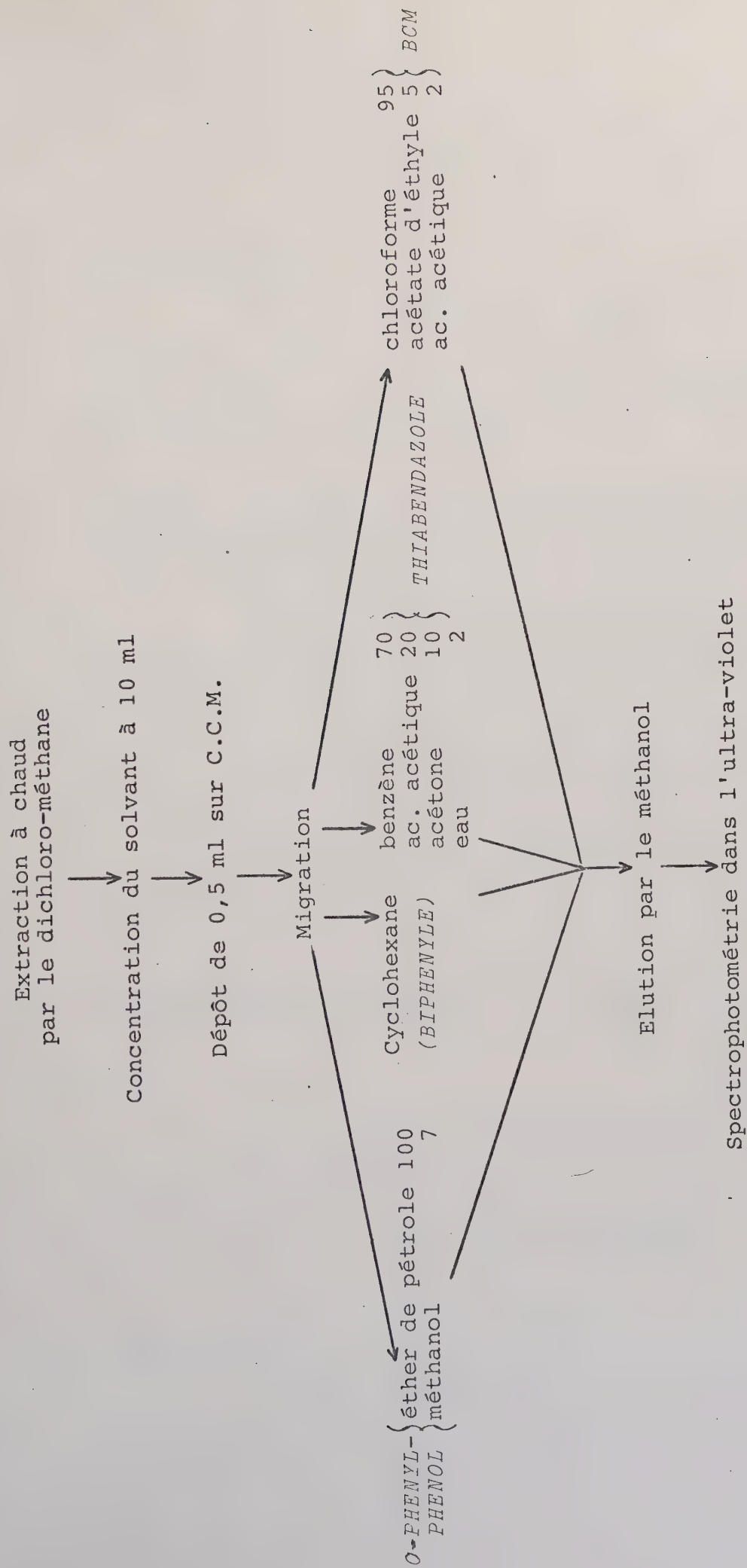


Figure 13 : SCHEMA DES METHODES DE DOSAGE DU BCM, THIABENDAZOLE, BIPHENYLE ET O-PHENYL-PHENOL.

2. RÉSULTATS DE L'ENQUÊTE

2.1... ECHANTILLONNAGE -

Nous avons effectué la recherche et le dosage de résidus de biphényle, d'O-phényl-phénol, de thiabendazole et de BCM dans les agrumes : oranges, pamplemousses, citrons, et clémentines (ou mandarines).

Les échantillons des divers agrumes analysés sont prélevés au hasard sur différents marchés ou magasins de la région lyonnaise (super-marchés, magasins couverts, marchés).

Certains agrumes se présentaient dans une enveloppe de papier ou en filet. Certains échantillons ont été choisis en fonction de leur provenance.

Les échantillonnages ont porté principalement sur la période allant de janvier 1976 à janvier 1977.

Les dosages sont effectués selon les techniques déjà décrites.

2.2... RESIDUS DANS LES AGRUMES -

2.2.1. BCM -

Sur 6 dosages de BCM effectués sur des agrumes pris au hasard sans mention "fruits traités", nous avons signalé une seule fois la présence de BCM à un taux dépassant le taux limite autorisé (1,64 mg/kg).

2.2.2. THIABENDAZOLE -

45 échantillons sont pris pour la recherche du thiabendazole. Dans 55 % des cas, le fongicide existe, mais toujours à des taux inférieurs aux doses limites autorisées

(les taux varient entre 0,57 et 4,8 mg/kg). 6 % des agrumes traités au thiabendazole ne portent pas la mention "fruits traités".

Les résultats figurent dans le tableau 18.

2.2.3. BIPHENYLE -

66 % des fruits analysés en vue de la recherche du biphényle (65 échantillons) sont traités par ce fongicide, mais à des taux ne dépassant pas le taux autorisé. Mais 6 % de ces fruits traités ne portaient aucune mention.

Les taux trouvés varient entre 0,6 et 9,8 mg/kg

Les résultats figurent dans le tableau 19.

2.2.4. O-PHENYL-PHENOL -

Sur 6 analyses effectuées, 4 ont mis en évidence de l'O-phényl-phénol. L'étiquetage était toujours respecté.

Les taux résiduels ne dépassaient pas les taux limites. Les taux trouvés varient entre 2,7 et 10,6 mg/kg.

Les résultats figurent dans le tableau 20.

D'après notre enquête, nous constatons que le biphényle existe toujours sur le marché, malgré les nombreux souhaits pour sa suppression et son remplacement par d'autres fongicides aussi efficaces et plus sûrs (comme le thiabendazole) (8^{bis}).

Actuellement, plus de la moitié des agrumes sont traités par le biphényle, ce qui a été montré dans le tableau 21.

TABLEAU 21 : AGRUMES TRAITES PAR DIFFERENTS FONGICIDES

FONGICIDE	ORANGES	PAMPLE- MOUSSES	CITRONS	MANDARINES CLEMENTINES
BIPHENYLE.....	53 %	63 %	58 %	
THIABENDAZOLE..	35 %	34 %	42 %	1 lot
O-PHENYL-PHENOL	9 %	3 %		
BCM.....	2 %			

Sur 108 dosages effectués, 33 % des agrumes ne sont pas traités :

- les analyses effectuées de janvier à avril 1976 montrent qu'il y a 15 échantillons non traités sur 41 ;
- en septembre 1976 : 8 échantillons non traités sur 40 ;
- et en octobre - novembre et décembre 1976 : 13 échantillons non traités sur 27 (donc presque 50 %).

2.3... CLASSIFICATION DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LEUR PROVENANCE -

La plupart des échantillons analysés proviennent des U.S.A. (22 %), de l'Espagne (21 %), d'Israël (18 %) et de l'Afrique du Sud (18 %).

Les autres proviennent de l'Argentine (11 %), du Maroc (4 %), d'Italie (2 %) et de Grèce (1 %).

(Tableaux 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

Plus de la moitié (54 %) des fruits traités en provenance de l'Espagne ne portaient aucune mention.

Par contre, les fruits traités qui provenaient des U.S.A. portaient toujours une mention nette et claire, et la seule fois où il n'y a eu aucune mention, nos recherches ont été négatives. Il en est de même des agrumes en provenance de l'Afrique du Sud.

Parmi les échantillons analysés en provenance d'Israël, un seul ne portait pas de mention et contenait 9,8 mg/kg de biphényle.

TABLEAU 17 : RECHERCHE DU BCM DANS LES AGRUMES
DES DIFFERENTS PAYS

AGRUMES	N°	PAYS	MENTION	CONCENTRATION mg/kg
Oranges.....	1	Espagne	-	N.D.
"	2	Afrique du Sud	-	N.D.
"	3	Espagne	-	N.D.
"	4	"	-	N.D.
"	5	?	-	1,64
Mandarines..	1	Espagne	-	N.D.

N.D. = non dosable

TABLEAU 18 : RECHERCHE DU THIABENDAZOLE DANS LES AGRUMES
DES DIFFERENTS PAYS

AGRUMES	N°	PAYS D'ORIGINE	MENTION	CONCEN- TRATION mg/kg	AUTRE FONGICIDE RECHERCHE
Oranges...	1	Espagne	-	N.D.	
"	2	Afrique du Sud	-	N.D.	
"	3	Espagne	-	N.D.	
"	4	"	-	N.D.	
"	5	"	-	N.D.	
"	6	"	-	N.D.	
"	7	Maroc	TBZ	4,095	
"	8	"	TBZ	1,769	
"	9	"	TBZ	1,90	
"	10	"	TBZ	2,73	
"	11	"	TBZ	1,343	
"	12	Espagne	TBZ	2,544	
"	13	"	-	0,720	
"	14	Afrique du Sud	TBZ	1,015	
"	15	" "	TBZ	0,786	
"	16	" "	TBZ	N.D.	
"	17	" "	TBZ	1,474	
"	18	" "	TBZ	N.D.	
"	19	Espagne	-	1,019	
"	20	Italie	-	N.D.	
"	21	Espagne	TBZ	N.D.	
"	22	"	OPP + TBZ	3,058	OPP : 2,776mg/kg
"	23	"	-	4,493	
Pamplemousses	1	Israël	-	N.D.	
"	2	"	TBZ	1,452	
"	3	"	TBZ	0,72	
"	4	"	TBZ	N.D.	
"	5	"	TBZ	1,998	
"	6	"	TBZ	0,797	
"	7	"	TBZ	1,616	

TABLEAU 18 (suite)

AGRUMES	N°	PAYS D'ORIGINE	MENTION	CONCEN- TRATION mg/kg	AUTRE FONGICIDE RECHERCHE
Pamplemousses	8	Israël	TBZ	N.D.	
"	9	"	TBZ	1,889	
"	10	Argentine	TBZ	0,578	
"	11	Afrique du Sud	TBZ	1,234	
"	12	" "	TBZ	N.D.	
"	13	" "	TBZ	N.D.	
"	14	" "	TBZ	0,628	
Citrons	1	Californie	TBZ	N.D.	
"	2	"	TBZ	N.D.	
"	3	"	Biphényle TBZ+OPP	N.D.	Biphényle 1,086mg/kg
"	4	"	TBZ	1,561	
"	5	"	TBZ	0,582	
Mandarines- Clémentines	1	Espagne	-	N.D.	
"	2	"	-	N.D.	
"	3	Grèce	TBZ	4,82	

TBZ = thiabendazole

OPP = ortho-phényl-phénol

TABLEAU 19 : RECHERCHE DU BIPHENYLE DANS LES AGRUMES
DES DIFFERENTS PAYS

AGRUMES	N°	PAYS D'ORIGINE	MENTION	CONCEN- TRATION mg/kg	AUTRE FONGICIDE RECHERCHE
Oranges.....	1	Espagne	-	N.D.	
"	2	Afrique du Sud	-	N.D.	
"	3	Espagne	-	N.D.	
"	4	"	-	N.D.	
"	5	Afrique du Sud	Biphényle	N.D.	
"	6	Israël	Biphényle	6,738	
"	7	Californie	Biphényle	6,641	
"	8	Afrique du Sud	Biphényle	0,646	
"	9	Argentine	Biphényle	1,431	
"	10	Californie	Biphényle	6,167	
"	11	"	Biphényle	6,324	
"	12	Israël	Biphényle	7,611	
"	13	Argentine	Biphényle	1,431	
"	14	Californie	Biphényle	7,547	
"	15	Afrique du Sud	Biphényle	0,603	
"	16	Californie	Biphényle	1,041	
"	17	"	Biphényle	4,143	
"	18	Israël	Biphényle	6,490	
"	19	Afrique du Sud	Biphényle	1,431	
"	20	Espagne	-	2,443	
"	21	Afrique du Sud	Biphényle	N.D.	
"	22	Israël	-	9,832	
"	23	Afrique du Sud	Biphényle	5,138	
"	24	Italie	-	N.D.	
"	25	Afrique du Sud	Biphényle	1,431	
"	26	" "	Biphényle	N.D.	
"	27	Espagne	-	1,237	
"	28	Californie	-	N.D.	
"	29	Espagne	Biphényle	N.D.	
"	30	"	Biphényle	N.D.	
"	31	"	-	N.D.	
"	32	"	-	N.D.	TBZ : 4,14 mg/kg

TABLEAU 19 (suite)

AGRUMES	N°	PAYS D'ORIGINE	MENTION	CONCEN- TRATION mg/kg	AUTRE FONGICIDE RECHERCHE
Pamplemousses	1	Israël	Biphényle	3,924	
"	2	"	Biphényle	0,970	
"	3	Texas	Biphényle	3,45	
"	4	Israël	Biphényle	0,927	
"	5	Texas	Biphényle	2,113	
"	6	"	Biphényle	1,789	
"	7	Floride	Biphényle	0,927	
"	8	"	Biphényle	3,374	
"	9	Israël	Biphényle	1,358	
"	10	"	Biphényle	5,390	
"	11	"	Biphényle	N.D.	
"	12	"	Biphényle	N.D.	
"	13	Argentine	Biphényle	1,431	
"	14	Californie	Biphényle	0,970	
"	15	Afrique du Sud	Biphényle	1,307	
"	16	" "	Biphényle	N.D.	
"	17	Argentine	Biphényle	1,215	
"	18	"	Biphényle	N.D.	
"	19	"	Biphényle	1,431	
"	20	"	Biphényle	0,862	
"	21	"	Biphényle	N.D.	
"	22	"	Biphényle	N.D.	
"	23	"	Biphényle	N.D.	
"	24	"	Biphényle	N.D.	
Citrons.....	1	Californie	Biphényle	4,215	
"	2	"	) Biphényle) TBZ + OPP	1,078	
"	3	"	Biphényle	1,091	
"	4	"	Biphényle	3,884	
"	5	"	Biphényle	2,587	
"	6	Espagne	-	4,471	
"	7	Californie	Biphényle	3,054	
"	8	"	Biphényle	1,782	
Mandarines	1	Espagne	-	N.D.	

TABLEAU 20 : RECHERCHE DE L'O-PHENYL-PHENOL DANS LES AGRUMES
DES DIFFERENTS PAYS

AGRUMES	N°	PAYS D'ORIGINE	MENTION	CONCEN- TRATION mg/kg	AUTRE FONGICIDE RECHERCHE
Oranges.....	1	Espagne	O.P.P.	4,448	
"	2	"	O.P.P.	2,84	
"	3	"	OPP + TBZ	2,776	TBZ : 3,058
"	4	"	-	-	TBZ = 4,493
"	5	"	O-phényl- phénate de sodium	N.D.	
Citrons.....	1	Espagne	O.P.P.	10,60	

TABLEAU 22 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DES ETATS-UNIS

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Citron.....	1	Biphényle	Biphényle	Biphényle	4,215
Pamplemousse.	2	Biphényle	Biphényle	Biphényle	3,450
Pamplemousse.	3	Biphényle	Biphényle	Biphényle	2,113
Citron.....	4	TBZ	TBZ	<limite de détection	
Pamplemousse.	5	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,789
Citron.....	6	TBZ	TBZ	<limite de détection	
Pamplemousse.	7	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,927
Citron.....	8	) Biphényle) TBZ) O.P.P.	) Biphényle) TBZ	Biphényle	1,078
Pamplemousse.	9	Biphényle	Biphényle	Biphényle	3,374
Citron.....	10	TBZ	TBZ	TBZ	1,561
Pamplemousse.	11	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,970
Citron.....	12	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,951
Orange.....	13	Biphényle	Biphényle	Biphényle	6,641
Orange.....	14	Biphényle	Biphényle	Biphényle	6,167
Orange.....	15	Biphényle	Biphényle	Biphényle	6,324
Orange.....	16	Biphényle	Biphényle	Biphényle	7,547
Orange.....	17	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,041
Orange.....	18	Biphényle	Biphényle	Biphényle	4,143
Citron.....	19	Biphényle	Biphényle	Biphényle	3,884
Citron.....	20	Biphényle	Biphényle	Biphényle	2,587
Citron.....	21	Biphényle	Biphényle	Biphényle	3,054
Citron.....	22	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,782
Orange.....	23	-	Biphényle	-	
Citron.....	24	TBZ	TBZ	TBZ	0,582

TABLEAU 23 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DE L'ESPAGNE

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Orange.....	1	-	)TBZ)BCM)Biphényle	-	
Orange.....	2	-	)TBZ)BCM)Biphényle	-	
Mandarine....	3	-	)TBZ)BCM)Biphényle	-	
Orange.....	4	-	TBZ	-	
Orange.....	5	-	TBZ	-	
Mandarine....	6	-	TBZ	-	
Orange.....	7	-	TBZ	-	
Orange.....	8	TBZ	TBZ	TBZ	2,544
Orange.....	9	-	TBZ	TBZ	0,720
Orange.....	10	-	Biphényle	Biphényle	2,443
Orange.....	11	-	TBZ	TBZ	1,019
Citron.....	12	-	Biphényle	Biphényle	4,477
Orange.....	13	-	Biphényle	Biphényle	1,237
Orange.....	14	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	15	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	16	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Orange.....	17	-	Biphényle	-	
Orange.....	18	O.P.P.	O.P.P.	O.P.P.	4,448
Orange.....	19	O.P.P.	O.P.P.	O.P.P.	2,84
Orange.....	20	OPP + TBZ	OPP + TBZ	OPP + TBZ	OPP 2,776 TBZ 3,058
Orange.....	21	-	)TBZ)Biphényle)OPP)BCM	TBZ	4,493
Pamplemousse.	22	O.P.P.	O.P.P.	O.P.P.	10,60
Orange.....	23	O-phényl- phénate de sodium	O.P.P.	< limite de détection	

TABEAU 24 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE D'ISRAEL

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Pamplemousse.	1	-	TBZ	-	
Pamplemousse.	2	TBZ	TBZ	TBZ	0,72
Pamplemousse.	3	Biphényle	Biphényle	Biphényle	3,924
Pamplemousse.	4	TBZ	TBZ	limite de détection	
Pamplemousse.	5	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,970
Pamplemousse.	6	TBZ	TBZ	TBZ	1,998
Pamplemousse.	7	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,927
Pamplemousse.	8	TBZ	TBZ	TBZ	0,797
Pamplemousse.	9	TBZ	TBZ	TBZ	1,343
Pamplemousse.	10	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Pamplemousse.	11	TBZ	TBZ	TBZ	1,889
Pamplemousse.	12	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,358
Pamplemousse.	13	Biphényle	Biphényle	Biphényle	5,390
Pamplemousse.	14	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Pamplemousse.	15	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	16	Biphényle	Biphényle	Biphényle	6,738
Orange.....	17	Biphényle	Biphényle	Biphényle	7,611
Orange.....	18	Biphényle	Biphényle	Biphényle	6,490
Orange.....	19	-	Biphényle	Biphényle	9,832
Pamplemousse.	20	TBZ	TBZ	TBZ	1,452

TABEAU 25 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DE L'AFRIQUE DU SUD

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Orange.....	1		) TBZ) BCM) Biphényle	-	
Orange.....	2	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	3	TBZ	TBZ	TBZ	1,015
Orange.....	4	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,646
Pamplemousse..	5	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,307
Pamplemousse..	6	TBZ	TBZ	TBZ	1,234
Orange.....	7	TBZ	TBZ	TBZ	0,786
Pamplemousse..	8	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Orange.....	9	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Pamplemousse..	10	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	11	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,603
Pamplemousse..	12	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Pamplemousse..	13	TBZ	TBZ	TBZ	0,628
Orange.....	14	TBZ	TBZ	TBZ	1,474
Orange.....	15	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,431
Orange.....	16	TBZ	TBZ	< limite de détection	
Orange.....	17	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Orange.....	18	Biphényle	Biphényle	Biphényle	5,138
Orange.....	19	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,431
Orange.....	20	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	

TABLEAU 26 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DE L'ARGENTINE

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Pamplemousse.	1	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,431
Pamplemousse.	2	TBZ	TBZ	TBZ	0,578
Orange.....	3	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,431
Orange.....	4	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,4
Pamplemousse.	5	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,215
Pamplemousse.	6	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Pamplemousse.	7	Biphényle	Biphényle	Biphényle	1,4
Pamplemousse.	8	Biphényle	Biphényle	Biphényle	0,862
Pamplemousse.	9	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Pamplemousse.	10	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Pamplemousse.	11	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	
Pamplemousse.	12	Biphényle	Biphényle	< limite de détection	

TABLEAU 27 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DU MAROC

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Orange.....	1	TBZ	TBZ	TBZ	4,095
Orange.....	2	TBZ	TBZ	TBZ	1,769
Orange.....	3	TBZ	TBZ	TBZ	1,90
Orange.....	4	TBZ	TBZ	TBZ	2,73
Orange.....	5	TBZ	TBZ	TBZ	1,343

TABLEAU 28 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DE L'ITALIE

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Orange.....	1	-	Biphényle	-	
Orange.....	2	-	TBZ	-	

TABLEAU 29 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
EN PROVENANCE DE LA GRECE

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Mandarine....	1	TBZ	TBZ	TBZ	4,82

TABLEAU 30 : RECHERCHE DES FONGICIDES DANS LES AGRUMES
D'ORIGINE INCONNUE

AGRUMES	N°	MENTION	FONGICIDE RECHERCHE	FONGICIDE TROUVE	CONCEN- TRATION mg/kg
Orange.....	1	-	BCM	BCM	1,64

CONCLUSIONS

Les méthodes habituelles de dosage des fongicides des agrumes nécessitant des processus extractifs distincts, il est apparu intéressant d'unifier ceux-ci. C'est pourquoi, au cours de ce travail, ont été rassemblés des éléments permettant d'abord une extraction commune à l'aide de l'appareil de Soxhlet, puis une séparation chromatographique suivie de spectrographie ultraviolette.

Grâce à la chromatographie sur couches minces, les fongicides ont pu être isolés et analysés sans interférences comme le prouvent les spectres enregistrés. Les rendements sont supérieurs à ceux obtenus par les méthodes comportant des purifications par extraction liquide-liquide.

Le protocole d'analyse des fongicides, biphényle, thiabendazole, O-Phényl-phénol et benzimidazole carbamate de méthyl, a pu être appliqué à divers lots d'agrumes. Sur 108 de ceux-ci, un tiers n'avait pas été traité et - à une exception près - le reste présentait des teneurs inférieures aux limites légales. Le biphényle et le thiabendazole restent actuellement les fongicides les plus employés pour le traitement des agrumes.

Vu, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R. DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

Ch.A. BIZOLLON

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

Vu ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 15 février 1977
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,

D. GERMAIN

B I B L I O G R A P H I E

1. ABDALLAH M.A., ABU-SALEM F.N., ISMAIL F.A. - Fungicidal residues on and in egyptian oranges.
- Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr., 1974, 24 (1-2), 127-136.
2. ABULLAEV Sh., GENKINA G.L., ATAKUZIEV A.A., SHAKIROV T.T., KADYROV Ch. Sh. - Chromato-spectro-photometric determination of fungicides in the preparation UZ gen.
- Zh. Anal. Khim., 1975, 30 (2), 3636, in C.A., 1975, 82, 165721 s.
3. AHARONSON NADAU, BEN AZIZ A. - Determination of residues of benomyl ; its hydrolysis product and thiabendazole in various crops.
- J.A.O.A.C., 1973, 56 (6), 1330-1334.
4. AHARONSON NADAV, KAFKAFI UZI - Adsorption, mobility and persistance of thiabendazole and methyl-2-benzimidazole carbamate in soils.
- J. Agric. Food Chem., 1975, 23 (4), 720-724, in C.A., 1975, 83, 92349 k.
5. AMBRUS A., HARGITAI E. - Identification and quantitative determination of benomyl and its metabolite residues using thin-layer chromatographic techniques.
- Environ. Qual. Saf. Suppl., 1975, 3 (Pesticides), 113-118.
6. AMMON R., BERNINGER H., BERNINGER I. - Application de la C.C.M. à la mise en évidence des métabolites du biphényle.
- Qualitas plantarum, 1968, 16, 263-270.
7. ANDREEVA E.I., SMIRNOVA K.F. - Determination of the penetration of fungicides into plant tissues by the use of modified methods.
- Khim. Sel. Khoz., 1968, 6 (8), 591-592.
8. ANONYME - Benomyl. Tolerances for residues.
- Fed. Regist., 26 Feb. 1974, 39 (39), 7422, in C.A., 1974, 81, 2476 f.
- 8^{bis}. ANONYME - Ces fongicides qu'on met sur les fruits.
- Bull. Information du Laboratoire coopératif, N° 112, janv. fév. 1977, p. 3.
- 8^{ter}. Laboratoire central de Massy-Palaiseau - 25, avenue de la République, 91300 Massy-Palaiseau.
- Cité par DA SILVA (49).

9. ANONYME - Agrumes traités contre les moisissures.
 - Bull. Information du Laboratoire coopératif d'analyses et de recherches, sept. oct. 1974, N° 98, 18-24.
- 9^{bis}. ANONYME - Sec. butylamine, tolerance for residues.
 - Fed. Regist., 7 Jul. 1972, 37 (131), 13348, in C.A., 1973, 79, 17047 z.
10. AUSTIN D.J., LORD K.A., WILLIAMS I.H. - High pressure liquid chromatography of benzimidazoles.
 - Pest. Sci. G.B., 1976, 7, (2), 211-222.
11. AUSTIN D.J., BRIGGS G.G. - A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies.
 - Pest. Sci. G.B., 1976, 7, (2), 201-210.
12. BAJAJ K.L., MILLER I.R., BHATIA I.S. - Metabolism of 2-hydroxy-biphenyl and 4-hydroxy-biphenyl in albino mice.
 - Indian J. Exp. Biol., 1976, 14 (3), 329-331. in C.A., 1976, 85, 172465 b.
13. BALINOVA A. - Thin layer chromatographic detection of some systemic fungicides and their metabolites.
 - J. Chromatogr., 1975, 111 (1), 197-199.
14. BAKER P.B., FARROW J.E., HOODLESS R.A. - Agricultural fungicides. Identification of systemic fungicides using thin-layer chromatography.
 - J. Chromatogr. 1973, 81, 174.
15. BAKER P.B., HOODLESS R.A. - Agricultural fungicides. Detection and identification of systemic benzimidazole fungicides on citrus fruits.
 - J. Chromatogr. 1973, 87, 585-588.
16. BAKER P.B., HOODLESS R.A. - Analytical methods for the detection and determination of residues of systemic fungicides.
 - Pestic. Sci., 1974, 5 (4), 465-472.
17. BARBIER M.C. - Le diphényle, ses emplois comme conservateur.
 - Exercice bibliographique du C.E.S. de Toxicologie à Lyon, 1968.
18. BARKAI-GOLAN R., KAHAN R.S. - Combined action of diphenyl and gamma-rad on the in vitro development of fungi pathogenic to citrus fruits.
 - Phyto-Pathology (U.S.A.), 1967, 57, N° 7, 696-698.
19. BAUDE F.J., GARDINER J.A., HAN JERRY C.Y. - Characterization of residues on plants following foliar spray applications of benomyl.
 - J. Agric. Food Chem., 1973, 21 (6), 1084-1090, in Analyt. A. 1974, 26, 3583.

20. BEERNAERT H. - Determination of biphenyl and 2-phenyl-phenol in citrus fruits by gaz chromatography.
- J. Chromatogr. 1973, 77 (2), 331-338.
21. BEN ARIE R. - Benzimidazole penetration, distribution and persistance in post-harvest treated peases.
- Phyto-Pathol., 1975, 65 (11), 1187-1189,
in C.A., 1976, 84, 70042 y.
22. BEN AZIZ A., AHARONSON N. - Persistence of benzimidazole derivatives in plants.
- Environ. Qual. Saf. Suppl., 1975, 3 (Pesticides, 135-139,
in C.A., 1975, 85, 117824 t.
23. BLANPIED G.D., PURNASIRI A. - Thiabendazole control of post harvest apple decay.
- Hort Science, 1970, 5 (6) (Sect. 1), 476-478,
in C.A., 1971, 74, 98330 h.
24. BOCCA A., CONSTANTINI S. - Gaz chromatographic determination of thiabendazole residues.
- Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment., 1975, 4 (5), 163-165,
in C.A., 1976, 84, 15731 x.
25. BOLDYREV B.G., GRIMM A.I. - Thiosulfonic acid esters as new preservatives for protecting fruits and vegetables from spoiling during storage.
- Fizial. Aktiv. Veschestva, 1971, N° 3, 148-154,
in C.A., 1972, 76, 42583 s.
26. BOOTH A.N., ANTHONY M.A., DEEDS F., COX J.R. A.Y. - The reversible nephrotoxic effects of biphenyl.
- Toxicol. Appl. Pharmacol., 1961, 3 (5), 560-567.
27. BOWYER J.W., CALAVAN E.C. - Antibiotic sensitivity in vitro of the mycoplasmalike organism associated with citrus stubborn disease (spiroplasma citri).
- Phyto-Pathol. (U.S.A.), 1974, 64 (3), 346-349,
in C.A., 1974, 81, 73247 t.
28. BREWERTON H.V., GIBBS M.M. - Benomyl /methyl N-(1-butyl-carbamoyl) benzimidazol-2-yl carbamate/ residues.
- N.Z.J. Exp. Agric., 1975, 3 (3), 289-292,
in C.A., 1976, 84, 3362 p.
29. BROWN G. Eldon - Post harvest citrus decay as affected by benlate applications in the grove.
- Proc. Fla. State Hortic. Soc. Nov., 1974 (Pub. 1975), 87, 237-240.
in C.A., 1975, 83, 112577 p.

30. BROWN G.E., ALBRIGO L.G. - Grove application of benlate for control of post harvest citrus decay.
- Proc. Fla. State Hort. Soc., 1970, 83, 222-225,
in C.A., 1971, 75, 87148 n.
31. BROWN G.E. - Experimental fungicides applied preharvest for control of post harvest decay in Florida citrus fruit.
- Plant. Dis. Rep., 1968, 52 (11), 844-847.
32. BUCHANAUER H., EDGINGTON L.V., GROSSMAN F. -
- Pest. Sci., 1973, 4, 343.
33. CALMON J.P., SAYAG D.R. - Kinetics and mechanisms of conversion of methyl 1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) to methyl 2-benzimidazole carbamate (MBC).
- J. Agric. Food. Chemic., 1976, 24 (2), 311-314,
in C.A., 1976, 84, 131466 p.
34. CALMON J.P., SAYAG D.R. - Kinetics and mechanisms of conversion of methyl 1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) to 3-butyl-2,4-dioxo/1,2 a/-S-triazinobenzimidazole (STB) and 1-(2-benzimidazolyl)-3-butylurea (BBU).
- J. Agric. Food Chem., 1976, 24 (2), 314-317,
in C.A., 1976, 84, 131467 q.
35. CALMON J.P., SAYAG D.R. - Instability of methyl 1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) in various solvents.
- J. Agric. Food Chem., 1976, 24 (2), 426-428,
in C.A., 1976, 84, 131468 r.
36. CALMON J.P., SAYAG D. - Mechanism of the hydrolysis of methyl 1-butyl-carbamoyl-benzimidazole carbamate in acid solution.
- C.R. Hebd.; Séance Acad. Sci. Ser. C, 1974, 279 (19) 883-885,
in C.A., 1975, 83, 163229 j.
37. CANUTI A. - Rapid identification of biphenyl in citrus fruit by gaz chromatography.
- Boll. Laboratori Chim. Prov., 1965, 16 (6), 660-662,
in Analyt. A. 1967, 14, 1702.
38. CASIDA J.E., LYKKEN L. - Metabolism of organic pesticides chemicals in high plants.
- Annu. Rev. Plant. Physiol., 1969, 20, 607-636.
39. CATELANI D., COLOMBI A. - Metabolism of biphenyl structure and physico-chemical properties of 2-hydroxy-6-oxo 6-phenyl hexa-2,4 dienoic acid, the meta cleavage product from 2,3-dihydroxy-biphenyl by Pseudomonas putida.
- Biochem. J., 1974, 142 (2), 431-434.

40. CHAMBON P., CHAMBON-MOUGENOT R. - Recherche et dosage du biphényle dans le pamplemousse.
- Bull. des travaux de la Société de Pharmacie de Lyon, 1968, T. XII, N° 4, 143-148.
41. CHARLES F. PIERSON - Fungicides for the control of blue mold rot of apples.
- Plant. Dis. Rep., 1966, 50 (12), 913-915.
42. CHIOFFI V. - Detection of biphenyl and O-phenyl-phenol on lemons by thin-layer chromatographyL
- Bull. Laboratori Chim. Prov., 1965, 16 (3), 366-376, in Analyt. A., 1966, 13, 5194.
43. CORNELIUSSEN P.E. - Determination of biphenyl in citrus fruits by thin layer chromatography and ultra-violet spectrophotometry.
- J. Ass. Off. Analyt. Chem., 1967, 50 (4), 934-938, in Analyt. A., 1968, 15, 6967.
44. COX J., PINEGARV J.A. - Benomyl residues in bananas.
- Pestic. Sci., 1976, 7 (2), 193-200, in C.A., 1976, 85, 92293 d.
45. COX J., DONEGAN L., PINEGAR J.A. - Estimation of surface residues of benomyl on treated bananas.
- Pestic. Sci., 1974, 5 (2), 135-145, in Analyt. A., 1974, 27, 2906.
46. CUILLE, YVON - Influence des traitements chimiques sur la conservation des agrumes.
- Fruits (Paris), 1954, 9, 314, cité par RAJZMAN (173).
47. CUILLE J. - Quelques conseils pratiques pour la lutte contre les Penicillium des agrumes.
- Paris, Institut des fruits et agrumes coloniaux, 1953, cité par RAJZMAN (173).
48. CUILLE J., BUR-RAVAULT L. - Traitements des oranges contre les Penicillium avec des formules à base de thiabendazole.
- Fruits, 1969, 21 (9-10), 421-424.
49. DA SILVA H., PEPIN G., BOUDENE Cl. - Résultats d'une enquête sur la présence de résidus de bénomyl et de thiabendazole dans des fruits et légumes vendus dans la région parisienne.
- Méd. Nutr., 1976, 12 (3), 181-187.
50. DAVENPORT J.E. - T.L.C. method for determination of O-phenyl-phenol residues in the acetonitrile extracts of fruits and vegetables.
- J. Ass. Off. Anal. Chemists (U.S.A.), 1971, 54 (4), 975-977, in C.A., 1971, 75, 47595 m.

51. DEHOVE R.A. - La réglementation des produits alimentaires et non alimentaires.
- 8e édition, commerce, éditions ED., Paris, 1974,
cité par PIERSON (168).
52. DEICHMANN W.B., KITZMILLER K.V., DIERKER M., WITHERUP S. -
- J. Ind. Hyg. Toxicol., 1947, 29, 1,
cité par WEIL (230).
53. DEL MATTO J. - Notes sur le papier "Crown" au diphényl.
- Fruits, 1951, 6, 62,
cité par RAJZMÁN (173).
54. DE LONG Ch. F., SHEPHERD T.H. - Produce coatings.
- U.S., 3, 669-691 (Cl. 99-168, A 23 b), 13 Jun. 1972,
Appl. 872, 016, 29 Oct. 1969,
in C.A., 1972, 77, 99923 c.
55. DELTORT G. - Essai de mise au point et de normalisation
d'un test biologique des substances fongicides et
fongistatiques de synthèse.
- Thèse en Pharmacie, Univ. Marseille, 1954, N° 7.
56. DE VOS R.H. - Sampling and analysis for biphenyl residues
in citrus fruit.
- Proc. Internat. Citrus Symposium, Riverside Calif.
Mar. 16-21 1968,
cité par GUNTHER (80).
57. DE VOS R.H. - The analysis of benomyl residues in crop
by a T.L.C. bioassay method.
- Environ. Qual. Saf., Suppl. 1975, 3 (Pesticides),
119-123,
in C.A., 1976, 85, 92279 d.
58. DOUCH P.G.C. - The metabolism of benomyl in mammals.
- Xenobiotica, 1973, 3 (6), 367-380,
in C.A., 1974, 80, 610 a.
59. DOUCHET J.P., HERVE J.J., QUERE G. - Qu'est-ce que les
thiophanates ?
- La Défense des Végétaux, sept. 1971, N° 151.
60. EBEL S., HEROLD G. - Determination of thiabendazole by
direct fluorometry after thin-layer chromatographic
separation.
- Dt. Lebensmittlrdsch., 1974, 70 (4), 133-136,
in Analyt. A., 1974, 27, 2945.
61. ECKERT J.W., KOLBEZEN M.J. - Effect of levels of thiaben-
dazole residues on sporulation of *Penicillium digitatum*
on citrus fruit.
- Rapport dated 11 June 1971 (a), Univ. Californie,
Riverside,
cité par RAJZMÁN (173).

62. ECKERT J.W., KOLBEZEN M.J. - Food additives in citrus fruits and their products committee on commodity problems F.A.O. group on citrus fruit (b).
- Third Session, Rome, 17-22, June 1963 : CCP/citrus/63, 11 March 1963,
cité par RAJZMAN (173).
63. ELDON BROWN G., Mc CORNACK A.A., SMOOT J.J. - Thiabendazole as a post harvest fungicide for Floridor citrus fruit.
- Plant. Dis. Rep., 1967, 51 (2), 95-98.
64. EL ZEFTAWI B.M. - Cool storage to improve the quality of Valencia oranges.
- J. Hortic. Sci., 1976, 51 (3), 411-418,
in C.A., 1976, 85, 122062 x.
65. ERNST W. - Der Stoffwechsel von Pesticiden in Säugetieren.
- Res. Rev., 1967, 18, p. 150.
66. ERWIN D.C., SIMS J.J., BORUN D.E., CHILDERS J.R. - Detection of the systemic fungicide thiabendazole in cotton plants and soil by chemical analysis and bioassay.
- Phyto-Pathol. (U.S.A.), 1971, 61, N° 8, 964-967.
67. EVEREST-TODD, SELWYN - Fungicide for agriculture and gardening containing thiabendazole.
- Ger. Off., 2, 528, 933, 22 Jan. 1976, Brit. Appl. 29, 199/74, 2 Jul. 1974,
in C.A., 1976, 84, 131515 d.
68. EVEREST-TODD, SELWYN - Fungicide for agriculture and gardening containing thiabendazole.
- 22 Jan. 1976, Brit. Appl. 29, 200/74, 2 Jul. 1974.
in C.A., 1976, 84, 116925 u.
69. FARKAS A., AMAN J. - The action of diphenyl on the Penicillium and Diplodia moulds.
- Palestine J. Bot. Jerusalem, Ser. 2, 38, 1940,
cité par RAJZMAN (173).
70. FERNANDES D.L., COLE J.S. - Comparison of solvents and methods of extracting methyl-2-benzimidazole carbamate (MBC) from tobacco.
- Pestic. Sci., 1974, 5 (3), 239-243.
71. FLEEKER J.R., MORGAN L.H., IMOGENE R.S., EVERIN C.H. - Persistence and metabolism of thiophanate-methyl in soil.
- J. Agr. Food Chem., Vol. 22, N° 4, 1974, 592-595.
72. FOSCHI S., PONTI I., SVAMPA G., FLORI P. - Systemic action of benzimidazolid fungicides.
- Ital. Agric., 1975, 112 (9), 96-104,
in C.A., 1976, 84, 85442 c.
73. FUCHS A., VAN DER BERG G.A., DAVIDSE L.C. - Comparison of benomyl and thiophanates with respect to some chemical and systemic fungitoxic characteristics.
- Pest. Biochem. Physiol., 1972, 2 (2), 191-205.

74. GARDINER J.A., KIRKLAND J., KLOPPING H.L. - Fate of benomyl in animals.
- J. Agr. Food Chem., 1974, 22 (3), 119-127,
in C.A., 1974, 81, 131354 p.
75. GERARDE H.W. - Toxicology and biochemistry of aromatic hydrocarbons.
- Elsevier Publishing Co, 1960,
cité par WEIL (230).
76. GESSLER C. - Mechanism of the resistance of fungi against benomyl.
- Phyto-Pathol. Z., 1976, 85 (1), 35-38,
in C.A., 1976, 84, 145867 g.
77. GOUNELLE H., de PONTANEL, TRUHAUT R., BOUDENE C., CLUET J.L. - Enquête sur les résidus du fongistatique biphényle dans les agrumes au stade de la consommation.
- Bull. Acad. Nat. Méd., 1970, séance du 10 février, 111-118.
78. GUNTHER F.A., OTT D.E. - Rapid automated determination of biphenyl in citrus fruit rind.
- Analyst. Lond., 1966, 91, 475-481.
79. GUNTHER F.A., GUNTHER J.D. - Chemistry of pesticides.
- Res. Rev., 1971, N° 36.
80. GUNTHER F.A. - Insecticide residues in California citrus fruits and products, developmental citrus residues analytical methodology with fresh fruits.
- Res. Rev., 1969, 28, 74-96.
81. GUTTER Y., YANKO U. - Protective effect of 4-benzimidazoles applied preharvest for the post harvest control of orange decay.
- Isr. J. Agr. Res., 1971, 21 (3), 105-109,
in C.A., 1972, 77, 1656 v.
82. GUTTER Y. - Various benzimidazoles for citrus fruit decay control.
- Pestic. Chem. Proc. Int. Congr. Pestic. Chem. 2nd, 1972, 5, 413-419,
in C.A., 1974, 80, 23439 r.
83. GUTTER Y. - Comparative effectiveness of benomyl, thia-bendazole and other antifungal compounds of post harvest control of *Penicillium* decay in Shamonti and Valencia oranges.
- Plant. Dis. Rep., 1969, 53 (6), 474-478.
84. HAHN H., THIER H.P. - G.L.C. determination of diphenyl and O-phenyl-phenol via their bromo derivatives.
- Mitteilungsbl. G.D. Ch. (Ges. Dent. Chem.), Fachgruppe Lebensmittel Chem. Gesichtl. Chem., 1972, 26 (10), 185-188,
in C.A., 1973, 78, 56552 j.

85. HAKKINEN I. - Diphenyl poisoning in fruit paper production.
A new health hazard.
- Arch. Environ. Health, 1973, 26 (2), 70-74.
86. HARDING P.R. Jr. - Comparison of fungicides 1991, thia-
bendazole, SOPP for control of *Penicillium* molds of
post harvest citrus fruits.
- Plant. Dis. Rep. (U.S.A.), 1968, 52 (8), 623-625,
in C.A., 1968, 69, 75733 z.
87. HARDING P.R. Jr. - Differential sensitivity to thiabenda-
zole by strains of *Penicillium italicum* and *digitatum*.
- Plant. Dis. Rep. (U.S.A.), 1972, 56 (3), 256-260,
in C.A., 1972, 77, 44169 f.
88. HARDING P.R. Jr. - Biphenyl induced variations in citrus
blue mold.
- Plant. Dis. Rep., 1959, 43, 649-653,
cité par BARBIER (17).
89. HARDING P.R., SAVAGE D.C. - Biphenyl resistant strains
of citrus blue mold.
- Calif. Citrograph., 1969, 46, 280-306,
cité par BARBIER (17).
90. HARRY R.J., SILBER R.H., GRAESSLE OTTO E. - Thiabendazole :
toxicological, pharmacological and antifungal properties.
- Tex. Rep. Biol. Med., 1969, 25 (suppl. 2), 537-560.
91. HELD P., GRUENZEL H. - Synergistic fungicide combinations.
- (East) 112, 337, 12 Apr. 1975, Appl. 179710, 5 Jul.
1974,
in C.A., 1976, 84, 116914 q.
92. HEY H. - Spectrophotometry and gaz chromatography of thia-
bendazole : ultra-violet spectrophotometric determi-
nation on citrus fruits and bananas.
- Z. Lebensmittelunters U., 1972, 149 (2), 79-86.
93. HOLMES M.G. - The determination of thiabendazole /2(4-thia-
zoly) benzimidazole/ in citrus fruit dips.
- Pestic. Sci. G.B., 1972, 3, N° 4, 367-370.
94. HOMANS A.L., FUCHS A. - Direct bioautography on thin-layer
chromatograms as a method for detecting fungitoxic
substances.
- J. Chromatogr., 1970, 51 (2), 327-329.
95. HOPPE H., ROMMINGER K. - Detection and semi-quantitative
determination of biphenyl and 2-phenyl-phenol on
citrus fruits.
- Nahrung., 1967, 11 (7-8), 797-808,
in Analyt. A., 1969, 16, 385.

96. HORSFALL J.G., CHAPMAN R.A., RICH S. - Relation of structure of diphenyl compounds to fungitoxicity.
- First Symp. on Chem. Biol. Corr. National Research Council Publ. 206, Washington D.C., 1951, cité par RAJZMAN (173).
97. HORSFALL J.G., LUKENS R.J. - The strategy of finding fungicides.
- Res. Rev., Vol. 25, p. 80.
98. INDEX DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES -
- BAILLY R., 1970.
99. ISSHAK Y.M., RIZK SHAKER S., YEHYA M.M., KALIL RAWHIA I., SALAMA S.B., ABOU SAIID S. - A new experimental fungicide (benlate) for citrus fruits.
- Agric. Res. Rev., 1974, 52 (3), 99-105,
in C.A., 1976, 85, 31759 p.
100. ISSHAK Y.M., RIZK S.S., KHALIL R.I., FAHMI B.A., SALAMA S.B. - Comparative study on several fungicides for citrus fruits.
- Agric. Res. Rev., 1973, 51 (5), 31-36,
in C.A., 1975, 82, 133893 h.
101. ISSHAK Y.M., RIZK S.S. - Long term storage of Valencia oranges treated by thiabendazole.
- Agr. Res. Rev., 1974, 52 (3), 85-98,
in C.A., 1976, 85, 76506 v.
102. JACOB T.A., CARLIN J.R., WALKER R.W., WOLF F.J., VAN DEN HEUVEL W.J.A. - Photolysis of thiabendazole.
- J. Agric. Food Chem., 1975, 23 (4), 704-709,
- in C.A., 1975, 83, 109773 u.
103. KILGORE WENDELL W., EARL R., WHITE - Decomposition of the systemic fungicide 1991 (benlate).
- Bull. Environ. Contamin. Toxicol. (U.S.A.), 1970, 5, N° 1, 67-69.
104. KIRKLAND J.J., HOLT R.F., PEASE H.L. - Determination of benomyl residues in soil and plant tissues by high-speed cation-exchange chromatography.
- J. Agric. Food Chem., 1973, 21 (3), 368-371,
in Analyt. A., 1974, 26, 1785.
105. KIRKLAND J.J. - High-speed liquid-chromatographic analysis for benomyl and/or metabolite residues in bovine milk, urine, faeces and tissues.
- J. Agric. Food Chem. 1973, 21 (2), 171-177,
in Analyt. A., 1973, 25, 2428.

106. KOENIGER M., OBERMAYER G. - Active combination for combating Botrytis and Peronospora.
 - Ger. Off., 2, 435, 484, 5 Feb. 1976, Appl. P 2435, 484, 5, 24 Jul. 1974,
 in C.A., 1976, 84, 146122 x.
107. KOLBEZEN M.J., ECKERT J.W., BRETSCHEIDER B. - Symp. dibromotetrachloro-ethane, analysis of formulation residues and metabolites.
 - Proc. Int. Citrus Symp. 1st, 1968, 2, 1071-1076,
 in C.A., 1970, 73, 75774 w.
108. KROELLER E. - Determination of residues of thiabendazole in orange peel.
 - Dt. Lehensmitt Rdsch., 1971, 67 (7), 229-231,
 in Analyt. A., 1972, 22, 3540.
109. KURAMOTO T. - Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in strains of Penicillium digitatum and Penicillium italicum in Japan.
 - Plant. Dis. Rep., 1976, 60 (2)? 168-172,
 in C.A., 1976, 84, 145872 e.
110. KURT E., WEINKE, LAUBER J.J., GREENWALD B.W., PREISSER F.A. - Thiabendazole, a new systemic fungicide.
 - Proc. Brit. Insectic. Fungic. Conf. 5th, 1969
 (Pub. 1970), 2, 340-346.
111. KVALVAG J. - New colorimetric procedure for the determination of benomyl.
 - Bull. Environ. Contam. Toxic., 1973, 10 (3), 137-139.
112. LAVILLE E. - Evolution des pourritures d'entreposage des agrumes avec l'utilisation de nouveaux fongicides de traitement après récolte.
 - Fruits, 1971, 26 (4), 301-304.
113. LAVILLE E., PIEDALLU L. - Etude de l'activité du méthylthiophanate sur les pourritures à Penicillium des agrumes.
 - Fruits, 1973, 28 (1), 33-35,
 in CNRS, 1973, 34, 380, 20526.
114. LEMPERLE E., KERNER E. - Ultra-violet spectrophotometric determination of benomyl residues in grapes, must and wine.
 - Z. Analyt. Chem., 1971, 254 (2), 117-119.
115. LHOSTE J. - Les fongicides, par Jean LHOSTE et Jean LAMBERT.
 - 3e éd. Morières, Rulhière, Libeccio, 1970.
 Institut de Phytopharmacie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille.

116. MAC NEIL J.D., HIKICHI M. - A rapid method for the quantitative analysis of benomyl on cherries by TLC and in situ fluorometry.
- J. Chromatog 1974, 101 (1), 33-39.
117. MAEDA MASAKO, TSUJI AKIO - Determination of benomyl and 2-(4-thiazolyl)-benzimidazole in plant tissues by high performance liquid chromatography using fluorimetric detection.
- J. Chromatog 1976, 120 (2), 449-455.
118. MAHMOOD T. - Emploi d'irradiations par le $^{60}\text{Co}^*$ pour inhiber la croissance de nombreuses moisissures.
- Pakis. J. Sci. Industr. Res., 1972, 15 (4-5), 268-272, in CNRS, 1974, 35, 380-2134.
119. MALHAN I. - Laboratory evaluation of benomyl against some plant pathogenic fungi.
- Indian Phyto-Pahtol., 1975, 28 (1), 76-79, in C.A., 1976, 85, 105176 v.
120. MARTENS P.H., CUS M. - Determination of benomyl in various vegetables and fruits and cereals.
- Meded. Rijkfac. Landbouwetensch., Gent., 172, 37 (2), 882-888, in Analyt. A., 1974, 26, 1255.
121. MASON, BRUNET, MINGA - Rapports entre l'action fongicide et la constitution chimique.
- Phyto-Pathol., 1951, 41, 164-171, cité par DELTORT (55).
122. MAZUR A.R., HUGHES T.D. - Nitrogen transformations in soil as affected by the fungicides benomyl, dyrene and maneb.
- Agron. J., 1975, 67 (6), 755-758, in C.A., 1976, 84, 175132 f.
123. MAC CARTHY W.J., WINEFORDNER J.D. - Use of thin-layer chromatography and phosphorimetry for rapid quantitative determination of biphenyl in oranges.
- J. Ass. Off. Agric. Chem., 1965, 48 (5), 915-922, in Analyt. A., 1967, 14, 1056.
124. MAC CORNACK A.A., BROWN G.E. - Benlate, an experimental post harvest citrus fungicide.
- Proc. Fla. State Hort. Soc., 1969, 82, 235-238, in C.A., 1970, 73, 54944 m.
125. MAC CORNACK A.A. - Status of post harvest fungicides for citrus fruits.
- Proc. Fla. State Hort. Soc., 1970, 83, 229-232, in C.A., 1971, 75, 75249 v.

126. MAC CORNACK A.A. - Handling Florida seedless grapefruit to reduce decay.
- Proc. Fla. State Hort. Soc., 1973, 86, 284-289,
in C.A., 1974, 81, 73251 q.
127. MAC CORNACK A.A. - Control of citrus fruit decay with post harvest application of benlate.
- Proc. Fla. State Hort. Soc., Nov. 1974 (Pub. 1975),
87, 230-233,
in C.A., 1975, 83, 112575 m.
128. MESTRES R., CHAVE Ch. - Dosage du biphényle dans les agrumes.
- Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1964, 24, 272.
129. MESTRES R., CHAVE C. - Pesticide residues : determination of biphenyl and O-phenyl-phenol in citrus fruit.
- Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1965, 24 (4), 272-282,
in Analyt. A., 1966, 13, 5193.
130. MESTRES R., DUDIEUZERE-PRIU M., GAILLARD J.C., TOURTE J. - Pesticide residues : determination of biphenyl or O-phenyl-phenol residues in citrus fruits after extractive distillation in a glycerol medium or after solvant extraction.
- Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 27 (2), 141-157, 1967,
in C.A., 1968, 68, 113399 j.
131. MESTRES R., DUDIEUZERE M., GAILLARD J.C., TOURTE J. - Résidus de pesticides. XIV : Recherche et dosage du biphényle et de l'O-phényl-phénol après extraction directe.
- Ann. Fals. . Expert. Chim., 1967, 60, 331-334.
132. MESTRES R., CHAVE C., DUDIEUZERE-PRIU M. - Recherche et dosage du biphényle dans les agrumes.
- Ann. Fals. . Expert. Chim., 1967, 60 (674), 73-80.
133. MESTRES R., CAMPO M., TOURTE J. - Pesticide residues. XXI : Determination of thiabendazole in citrus fruits and bananas.
- Ann. Fals. . Expert. Chim., 1970, 63 (63), 160-173,
in Analyt. A., 1972, 22, 1168.
134. MESTRES R., TOURTE J., CAMPO M. - Dosage des résidus de bénomyl dans les fruits et les légumes.
- Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier, 1971, 31,
Fasc. 1, 49-56.
135. MESTRES R. - Analyse de résidus de pesticides : étude de résultats de la méthode d'analyse multiple de recherche dans les aliments par chromatographie en phase gazeuse.
- Actualités de chimie analytique, organique, pharmaceutique et bromatologique, 21e série, Masson Ed., Paris, 1972.

136. MESTRES R., CAMPO M., TOURTE J. - Résidus de pesticides. Recherche et dosage du thiabendazole dans les agrumes et les bananes (méthode adaptée aux nouvelles tolérances).
- Ann. Falsif. Expert. Chim., 1972 (65), 315-321.
137. MESTRES R., TOURTE J., CAMPO M. - Dosage des résidus de bénomyl dans les fruits et les légumes.
- Ann. Falsif. Expert. Chim., 1972, 65, 239-246.
138. MESTRES R., TOURTE J., CAMPO M., ILLES S., CORNET R. - Résidus de pesticides. XXVI : Note sur le dosage des résidus de thiabendazole dans les agrumes et les bananes.
- Extrait Ann. Fals., 1974 (nov. déc.), N° 723-724, 585-598.
139. MESTRES R., GNAEGI F., TOURTE J., CAMPO M. - Résidus de pesticides. Dosage des résidus de fongicides à noyau benzimidazole et des thiophanates dans les raisins, les jus de raisin et les vins, et en général dans les fruits et légumes.
- Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier, 1974, 34, Fasc. 1, 91-100.
140. MESTRES R., TOURTE J., CAMPO M. - Note sur le dosage des résidus de bénomyl, de thiabendazole et de thiophanate dans les fruits ou les légumes, séparément ou associés.
- Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier, 1974, 34, Fasc. 2, 131-140.
141. MESTRES R., TOURTE J., CAMPO M., ILLES S. - Note sur la technique de dosage des résidus de bénomyl dans les fruits et les légumes.
- Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier, 1974, 34, Fasc. 4, 367-370.
142. MESTRES R., ILLES S., TOURTE J., CAMPO M., GAILLARD J.C. - Méthode rapide de contrôle et de dosage des résidus d'O-phényl-phénol et de biphenyle dans les agrumes.
- Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier, 1975, 35; Fasc. 1, 87-100.
143. MEYER T., SCHELIN R.R. - The metabolism of biphenyl. II : Phenolic metabolites in the rat.
- Acta Pharmacol. Toxicol., 1976, 39 (4), 419-432, in C.A., 1976, 85, 138143 k.
144. MIHARA M., KONDO T., TANABE H. - Food additives in imported foods. Analysis of thiabendazole in citrus fruits.
- Shokulin Eiseigaku Zasshi, 1973, 14 (2), 179-185, in C.A., 1974, 80, 35871 p.

145. MILLER-VERNON L., GOULD C.J., CSONKA E. - Estimation of benomyl in the milligram range.
- J. Agric. Food Chem., 1974, 22 (1), 93-95.
146. MILLER-VERNON L., GOULD C.J., CSONKA E. - Measurement of thiabendazole, benomyl and folcadin fungicides in aqueous suspensions.
- J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1975, 58 (5), 971-973.
147. MORRIES P. - Determination of biphenyl and 2-phenyl-phenol in (the peel of) citrus fruit by gaz chromatography.
- J. Ass. Publ. Analysts, 1973, 11 (2), 44-46,
in Analyt. A., 1974, 26, 517.
148. MUIRHEAD I.F. - Resistance to benzimidazole fungicides in blue mold of citrus in Queensland.
- Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb., 1974, 14 (70), 698-701,
in C.A., 1975, 82, 52501 b.
149. NEWELL G.W. - Rapport inédit du "Stanford Research Institute" communiqué à l'Organisation Mondiale de la Santé, ayant servi à l'évaluation toxicologique des résidus de biphényle par le Comité mixte d'experts.
- FAO/OMS, 1953,
cité par GOUNELLE (77).
150. NORDAL J. - Fungistatika i citrusfrukter og citrus produkter.
- Saertrykk av Norsk Veterinaertidsskrift, 1970, 82, 469-473.
151. NORDAL J. - Detection of fungistatics in foods.
- Nor. Vet. Tisskr., 1972, 84 (2), 91-94,
in C.A., 1972, 77, 18184 n.
152. NORMAN S., RYGG G.L., WELLS A.W. - Improved celanups method for determination of biphenyl in citrus fruit and in biphenyl impregnated Kraps papers by TLC.
- J. Assoc. Off. Agric. Chem., 1966, 49, 590-595.
153. NORMAN S.M., FOUSE D.C., CRAFT C.C. - T.L.C. separation and spectrofluorimetric determination of thiabendazole residues on and in citrus.
- J. Ass. Off. Anal. Chem., 1972, 55 (6), 1239-1244.
154. NORMAN S.M., FOUSE D.C., CRAFT C.C. - Conditions d'échantillonnage et de préparations des échantillons pour appliquer la méthode de dosage ci-dessus.
- J. Agric. Food Chem. (U.S.A.), 1972, 20 (6), 1227-1230,
cité par PIERSON (168).

155. NORMAN S., FOUSE D.C., CRAFT C.C. - Determination of thiabendazole residues on and in citrus fruit.
- J. Agric. Food Chem., 1972, 20 (6), 1239.
156. NORMAN S.M., FOUSE D.C., CRAFT C.C. - Thin-layer chromatographic separation and spectrofluorimetric determination of thiabendazole residues on and in citrus.
- J. Ass. Off. Analyt. Chem., 1972, 55 (6), 1239-1244.
157. ODDOUX L. - Cours de Phytopharmacie à la Faculté de Pharmacie de Lyon.
- 1975-1976.
158. O.M.S. - Evaluation de quelques résidus de pesticides dans les denrées alimentaires.
- O.M.S., série "résidus de pesticides", 1972, N° 2.
159. OTT D.E. - Automated fluorimetric determination of thiabendazole.
- J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1975, 58 (1), 160-162.
160. OTTENEDER H., HEZEL U. - Quantitative routine determination of thiabendazole by fluorimetric evaluation of thin-layer chromatography.
- J. Chromatogr. 1975, 109, 181-187.
161. OWENS R.G. - Metabolism of fungicides and related compounds.
- Ann. N.Y. Acad. Sci., 1969, 160 (1), 114-132.
162. PEASE, GARDINER - Fluorimetric and colorimetric procedures for determining residues of benomyl.
- J. Agric. Food Chem. (U.S.A.), 1969, 17, N° 2, 267-270.
163. PEASE H.L., HOLT R.F. - Improved method for determining benomyl residues.
- J. Ass. Off. Anal. Chem., 1971, 54 (6), 1399-1402, in C.A., 1972, 76, 12871 s.
164. PELLIZZARI G., GAITER -
- Gazz. Chim. Ital., 48 II, 1918, 151, cité par KVALVAG (111).
165. PETERSON C.A., EDGINGTON L.V. - Quantitative estimation of the fungicide benomyl using a bioautograph technique.
- J. Agr. Food. Chem., 1969, 17 (4), 895-896, in C.A., 1969, 71, 59975 r.
166. PETERSON C.A., EDGINGTON L.V. - Transport of benomyl into various plant organs.
- Phyto-Phatol. (U.S.A.), 1971, 61, N° 1, 91-99.

167. PHILIPS, DOUGLAS J. - Detection and translocation of benomyl in post harvest treated peaches and nectarines.
- J. Phyto-Pathol., 1975, 65 (3), 255-258.
168. PIERSON M. - Angifongiques des agrumes.
- Rapport bibliographique du C.E.S. de toxicologie, Lyon, 1975.
169. PIORR W., TOTH L. - Detection and determination of biphenyl, O-hydroxy-biphenyl and diphenylamine by thin-layer and gaz chromatography and spectrofluorimetry.
- Lebensm. Unters. Forsch., 1967, 135 (5) 260-269, in C.A., 1968, 68, 72209 b.
170. PRASAD R., TRAVNICK D. - Translocation of benomyl in elm (*Ulmus americana* L.). VI : Effects of soil applications on root uptake and distribution in mature trees.
- Chem. Control Res. Inst., Ottawa, Inf. Rep. CCX, 1975, CC-X 54, in C.A., 1975, 85, 1109 j.
171. PRASAD R., MOODY R.P. - Translocation of benomyl in elm (*Ulmus americana* L.). IX : Some ecological consequences of the treatments on population dynamics of earthworms (*Lumbricus terrestris* L.).
- Chem. Control Res. Inst., Ottawa, Inf. Rep. CC-X, 1974, CC-X, 81, in C.A., 1975, 84, 145648 m.
172. RAIG P., AMMON R. - Nachweis einiger neuer phenolischer Stoffwechselprodukte des Biphenyls.
- Arzneimittel Forsch., 1972, 22 (8), 1399-1404, cité par PIERSON (168).
173. RAJZMAN A. - Les résidus de biphényle dans les agrumes.
- Res. Rev., 1965, 8, 1-73.
- 173^{bis}. RAJZMAN A. - Elimination du biphényle des écorces d'agrumes.
- Ann. Nutrition et Aliment., 1961, 15, 239, cité par RAJZMAN (173).
174. RAJZMAN A. - A colorimetric method for the determination of 2-phenyl-phenol residues in citrus fruits.
- Analyst., 1972, 97, 271-278.
175. RAJZMAN A., APELBAUM A., HELLER H. - Effet du phényl-2-phénate de sodium appliqué par enrobage cireux sur l'apparition d'altérations des agrumes.
- Pestic. Sci. (G.B.), 1972, 3 (), 585-590, in CNRS, 1973, 34, 380, 13414.
176. RAJZMAN A. - Determination of thiabendazole in citrus fruits by ultra-violet spectrophotometry.
- Analyst. Lond., 1974, 99, 120-127.

177. RAMZEY G.M., SMITH M.A., HEBERG B.C. - Fungistatic action of diphenyl on citrus fruit pathogens.
- Botan. Gaz., 1944, 74, 106,
cité par RAJZMAN (173).
178. REINHARD C. - Schnellmethode zum Nachweis von Thiabendazole, Diphenyl, Ortho-hydroxy-phenyl und Diphenylamin in Zitrusfruchtschalen.
- Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel., 1973, 2 (2), 57-59,
in C.A., 1973, 79, 124782 g.
179. RENVALL S., AKERBLOM M. - Determination of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables on the swedish market from 1964-1968.
- Res. Rev., 1971, 34, 20.
180. RHODES R.C., JAMES D. LONG - Run off and mobility studies on benomyl in soils and turf.
- Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1974, 12 (4), 385-393.
181. RIZK SHAKER S., ISSHAK Y.M. - Thiabendazole as a post harvest disinfectant for citrus fruits.
- Agric. Res. Rev., 1974, 52 (3), 39-46.
182. ROMMINGER K., HOPPE H. - Determination of thiabendazole on citrus fruits and bananas.
- Nahrung, 1976, 20 (4), 407-417,
in C.A. 1976, 85, 121925 u.
183. ROSENBLUM C., MERIWETHER H.T. - Determination by the radioactive indicator method of the retention and stability of thiabendazole in treated "Valencia" oranges.
- J. Radio-anal. Chem., 1970, 6 (2), 379-384,
in C.A., 1971, 74, 98714 m.
184. ROUCHAUD J.P., DECALLONNE J.R., MEYER J.A. - Metabolic fate of methyl 2-benzimidazole carbamate in melon plants.
- Phyto-Pathol., 1974, 64 (12), 1513-1517,
in C.A., 1975, 82, 81563 d.
185. SALO T., MAKINEN R. - Thin-layer chromatography of substances used for treatment of citrus fruit peel : biphenyl, O-phenyl-phenol and 2,4-D.
- Z. Lebensmittelunters u. Forsch., 1964, 125 (3), 170-171,
in Analyt. A., 1966, 13, 410.
186. SAX I. - Dangerous properties of industrial materials.
- Sec. Ed. Reinhold Publishing Corporation, 1963,
cité par WEIL.

187. SCHIFFMANN-NADEL M., LATTER F.S., WAKS J. - The effect of 2,4-D applied in waxes on the preservation of "Marsh seedbers" grapefruit and "Valencia" orange during storage.
 - Hortscience (U.S.A.), 1972, 7 (2), 120-121,
 in CNRS, 1972, 33, 380, 20148.
188. SCHIFFMANN-NADEL M., CHALUTZ - Reduction of chilling injury in grapefruit by thiabendazole and benomyl during long-term storage.
 - J. Am. Soc. Hortic. Sci., 1975, 100 (3), 270-271,
 in C.A., 1975, 83, 142971 e.
189. SEBERRY J.A., BALDWIN R.A. - Thiabendazole and 2-amino-butane as post harvest fungicides for citrus.
 - Austr. J. Exper. Agric. Animal. Husbandry, 1968, 8,
 N° 33, 4403,
 in CNRS, 1969, 30, 380-8155.
190. SHAIKH I.A., IKRAMUL-MAQC M.Y. - Preservation of citrus fruits with fungicidal wax emulsion.
 - Pak. J. Sci. Ind. Res., 1971, 14 (6), 526-530,
 in C.A., 1972, 77, 46828 u.
191. SHERMA J. - Quantitation of benomyl and its metabolites by thin-layer densitometry.
 - J. Chromatogr. 1975, 104 (2), 476-479.
192. SHERMA J. - Chromatographic analysis of fungicides.
 - J. Chromatogr. 1975, 113, 97-137.
193. SHERMAN H., CULIK R., JACKSON R.A. - Reproduction, teratogenic and mutagenic studies with benomyl.
 - Toxicol. Appl. Pharmacol., 1975, 32 (2), 305-315,
 in C.A., 1975, 83, 91968 z.
194. SMOOT J.J., MELVIN C.F. - Comparison of post harvest fungicides for decay control of Florida oranges.
 - Proc. Fla. State Hort. Soc., 1969, 82, 243-246,
 in C.A., 1970, 73, 54945 n.
195. SMOOT J.J., MELVIN C.F. - Decay control of Florida citrus fruits with packinghouse applications of thiabendazole.
 - Proc. Fla. State Hort. Soc., 1970 (Pub. 1971), 83,
 225-228,
 in C.A., 1971, 75, 74987 x.
196. SMOOT J.J., MELVIN C.F. - Decay of degreened citrus fruit as effected by time of washing and thiabendazole application.
 - Proc. Fla. State Hort. Soc., 1972 (Pub. 1973), 85,
 235-238,
 in C.A., 1973, 79, 39211 a.

197. SMOOT J.J., MELVIN C.F. - Decay control of oranges with benomyl by three methods of post harvest application.
 - Proc. Fla. State Hort. Soc., Nov. 1974 (Pub. 1975),
87, 234-236,
 in C.A., 1975, 83, 112576 n.
198. SOEDA Y., KOSAKA S., NOGUCHI T. - Identification of alkyl benzimidazol-2-yl-carbamates as major metabolites of thiophanate fungicides in/on the bean plant (*Phaseolus vulgaris*).
 - Agric. Biol. Chem., 1972, 36 (5), 817-823,
 in Analyt. A., 1972, 23, 4989.
199. SOMMA V., SALERNO M. - Field tests on the efficacy of benomyl against citrus dry rot.
 - Phyto-Pathol. Mediterr., 1974, 13 (3), 143-146,
 in C.A., 1975, 83, 158977 x.
200. SOUCI S.W., MAIER-HAARLANDER G. - Investigations on the analysis of biphenyl I.
 - Z. Lebensmitt. Untersuch., 1963, 119 (3), 217-222,
 in Analyt. A., 1965, 12, 3033.
201. SOUCI S.W., MAIER-HAARLANDER G. - Über den Diphenylgehalt und Geruch von Citrus Früchten und Citruserzeugnissen sowie den Übergang von Diphenyl auf unbehandelte Früchte bei der Lagerung.
 - Res. Rev., 1966 I 16, 103-138.
202. SOUCI S.W. - Biphenyl and O-phenyl-phenol as post harvest fungistats in citrus fruits and citrus products.
 - Proc. Int. Citrus Symp. 1st, 1968, 2, 1087-1096,
 in C.A., 1970, 73, 119541 z.
203. SPERLICH - Detection of biphenyl, O-phenyl-phenol and thiourea in citrus fruits.
 - Z. Lebensmitt. Untersuch., 1963, 123 (4), 269-278,
 in Analyt. A., 1965, 12, 1417.
204. STARON T., ALLARD C., DARPOUX H., GRABOUSKI H., KOLLMANN A. - Persistance du thiabendazole dans les plantes. Propriétés systémiques de ses sels et quelques données nouvelles sur son mode d'action.
 - Phytat. Phytopharm., 1966, 15 (2), 129-133.
205. STEURBAUT W., DEJONCKHEERE W., KIPS R.H. - Residues of benomyl, biphenyl, O-phenyl-phenol and thiabendazole in citrus fruits, bananas and derived products.
 - Mededelingen Faculteit. Landboowetenschappen Gent., 1974, 39 (2), 1325-1336.

206. SUBRAMANYAN T.M., LAKSHMINA R., MOORTHY N.V.N., SUBHADRA N.V. - The effect of isopropyl-N phenyl carbamate and fungicidal wax coatings on coorg mandarins to control spoilage.
- Trop. Sci. (G.B.), 1970, 12, N° 4, 307-313,
in C.A., 1971, 75, 97338 a.
207. SUBRAMANYAN T.M., SADASIVAN R., RAMAN N.V. - Screening of some fungicides for the control of storage decay in mandarine orange (*Citrus reticulata*).
- Indian J. Agr. Sci., 1973, 43 (3), 284-287,
in C.A., 1974, 80, 104724 g.
208. SUZUKI J., TOMOMATSU T. - Determination of biphenyl in citrus fruits by T.L.C.
- Tokyo Toriton Eisei Kenkyusko Kenkyu Nempo, 1971, 23, 231-235,
in C.A., 1973, 78, 122751 b.
209. TANAKA A., FUJIMOTO Y. - Colorimetric determination of biphenyl based on the Janovsky reaction.
- Agric. Biol. Chem., 1974, 38 (9), 1575-1579,
in C.A., 1975, 82, 2736 m.
210. TANAKA A. - Colorimetric determination of biphenyl in citrus fruits.
- Agric. Biol. Chem., 1975, 39 (3), 723-724,
in C.A., 1975, 83, 7292 u.
211. TANAKA A., FUJIMOTO Y. - Gas chromatographic determination of thiabendazole in fruits as its methyl derivative.
- J. Chromatog., 1976, 117 (1), 149-160.
212. THIELEMANN H. - Comparison of detection sensitivities of biphenyl with different developing reagents on ready-made sheets and on silica gel G layers.
- Z. Analyt. Chem., 1974, 272 (3), 206.
213. THIOLLIERE J., FAILLET P. - Qu'est-ce que le benomyl ?
- Déf. Vég. Fr., 1970, 24, N° 143, 157-172.
214. TJAN G.H., BURGERS L.J. - Thin-layer chromatographic detection of thiabendazole and benomyl in fruits.
- J. Ass. Off. Analyt. Chem., 1973, 56 (1), 223-225.
215. TOCCO D.J., ROSENBLUM C., MARTIN C.M., HARRY J.R. - Absorption, metabolism and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals.
- Toxicol. Appl. Pharmacol., 1966. 9, 31-39.
- 215bis. TOMKINS R.G., ISHERWOOD T.A. - The absorption of diphenyl and O-phenyl-phenol by oranges from treated wraps.
- Analyst., 1945, 70, 330,
cité par BARBIER (17).

216. TONOGAI Y., ITO Y., IWAIDA M., HIROK S. - A simplified procedure for the determination of diphenyl, O-phenylphenol and thiabendazole in citrus fruits.
- Eisei Kagaku, 1975, 21 (4), 235-237,
in C.A., 1976, 84, 88057 s.
217. TONOGAI Y., HIROKO S., ITO Y., IWAIDA M. - Systemic procedure for the determination of diphenyl, O-phenylphenol and thiabendazole in citrus fruits.
- Shokutrin Eiseigaku Zasshi, 1975, 16 (6), 397-405,
in C.A., 1976, 84, 147092 z.
218. TORCHINSKII A.M., ORLOVA N.V. - Data on the toxicological hygienic characteristics of benlate, a pesticide of the carbamate group.
- Org. Sanit., 1976 (2), 35-39,
in C.A., 1976, 84, 145650 f.
219. ULRICH R., MARCELLIN P. - La protection de la qualité des fruits et des légumes frais par l'emploi de procédés autres que le froid.
- Ann. Nutr., 1955, 9, 265-295,
cité par BARBIER (17).
220. VAN MIDDELEM - Review of pesticides in Florida citrus and products.
- Proc. Internat. Citrus Symposium, Riverside, Calif., Mar. 1968, 16-26,
cité par GUNTHER (80).
221. VOGEL J., DESHUSSESS J. - Detection and determination of biphenyl in citrus fruits by gaz chromatography.
- Mitt. Lebensmitt. Hyg. Bern., 1964, 55 (2), 84-92,
in Analyt. A., 1965, 12, 3535.
222. VOGEL J., DESHUSSESS J. - Modification of method for determining biphenyl in citrus fruits by gaz chromatography.
- Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg., 1965, 56 (3), 185-189,
in Analyt. A., 13, 5192.
223. VOGEL J., CORVI C., VEGRAT G. - Determination of the residues of methyl 1-(butyl-carbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) by thin-layer chromatography.
- Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg., 1972, 63 (3), 453-456,
in C.A., 1973, 78, 96141 f.
224. VON STRYK F.G. - Separation and determination of some systemic fungicides and their metabolites by thin-layer chromatography.
- J. Chromatogr., 1972, 72 (2), 410-412.
225. WALTER D. BLOCK, HERBERT H. CORNISH - Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit.
- J. Biol. Chem., 1959, 234 (12), 3301-3302.
226. WARDOWSKI W.F., HAYWARD F.W., DENIS J.D. - Flood recovery thiabendazole fungicide treatment system for citrus fruits.
- Proc. Fla. State Hort. Soc. Nov., 1975 (Pub. 1975) 85, 241-243,
in C.A., 1975, 83, 130213 w.

227. WATKINS David A.M. - Photolysis of methyl-benzimidazole-2-carbamate.
- Chemosphere, 1974, 3 (5), 239-240.
228. WATKINS David A.M. - Photolysis of thiabendazole.
- Chemosphere, 1976, 5 (2), 77-78.
229. WATKINS David A.M. - Benzimidazole pesticides : analysis and transformations.
- Pest. Sci. (G.B.), 1976, 7, N° 2, 184-192.
230. WEIL E., KUSTENER L., BROGARD M.H. - Intolérance à un produit d'imprégnation antifongique des emballages d'agrumes.
- Arch. Mal. Prof. Fr., 1965, 26 (7-8), 405-408.
231. WESTOO G. - Determination of biphenyl in citrus fruits.
- Analyst. Lond., 1969, 94, 406-409.
232. WESTOO G., ANDERSSON A. - Determination of biphenyl and 2-phenyl-phenol in citrus fruits by gaz liquid chromatography.
- Analyst. Lond., 1975, 100 (1188), 173-177.
233. WHITE E.R., WENDELL W., KILGORE - Determination of systemic methyl benzimidazol-2)yl-carbamate residues in food crops treated with benomyl fungicide.
- J. Agric. Food Chem., 1972, 20 (6), 1230-1232.
234. WHITE T.D. - Automated method for the determination of thiabendazole.
- Proc. Soc. Anal. Chem., 1973, 10 (1), 10-11.
235. WOZNIAK J., TOKARZ A. - Determination of biphenyl in lemons, oranges, and grapefruits using gaz chromatography.
- Procz. Panstw. Zakl. Hig., 1976, 27 (2), 177-184, in C.A., 1976, 85, 61517 a.
-

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
I. INTRODUCTION.....	1
II. TRAVAUX ANTERIEURS.....	3
1. Les traitements antifongiques.....	4
1.1. Traitement chimique.....	4
1.2. Traitement antibiotique.....	8
1.3. Traitement mécanique.....	9
1.4. Traitement physique.....	9
1.5. Traitement avant récolte.....	10
2. Problèmes soulevés par l'emploi des antifongiques.....	11
2.1. Les avantages.....	11
2.2. Les inconvénients.....	14
3. Propriétés physico-chimiques.....	20
4. Mécanisme d'action des fongicides.....	23
5. Rapport structure - activité.....	26
6. Transformation biologique et physico-chimique	32
7. Etude de la pénétration et de la rémanence..	39
8. Dosage des fongicides.....	41
8.1. Dosage du bénomyl et du BCM.....	42
8.2. Dosage du thiabendazole.....	51
8.3. Dosage du biphényle.....	56
8.4. Dosage de l'O-phényl-phénol.....	61
9. Toxicologie.....	65
10. Aspect législatif.....	70
11. Résultats d'enquêtes.....	74

	<u>Pages</u>
III. TRAVAUX PERSONNELS.....	80
1. Recherche d'une méthode d'analyse applicable aux fongicides d'agrumes.....	81
1.1. Choix d'un solvant de migration avec les étalons de référence.....	81
1.2. Recherche d'une technique d'extraction et de séparation des fongicides extraits d'agrumes.....	81
1.2.1. Cas du BCM.....	81
- Technique après extraction à froid.....	81
- Technique après extraction à chaud.....	82
- Discussion.....	82
1.2.2. Cas du thiabendazole.....	82
1.2.3. Cas du biphényle.....	83
1.2.4. Cas de l'O-phényl-phénol.....	85
1.3. Techniques adoptées.....	93
1.3.1. Dosage du BCM.....	93
- Principe.....	93
- Matériels et réactifs.....	93
- Technique.....	94
- Rendement.....	96
- Sensibilité.....	97
- Reproductibilité.....	97
- Etude de la stabilité du BCM..	97
- Discussion.....	98
1.3.2. Dosage du thiabendazole.....	102
1.3.3. Dosage du biphényle.....	111
1.3.4. Dosage de l'O-phényl-phénol.....	118
1.4. Schéma général.....	126
2. Résultats de l'enquête.....	128
2.1. Echantillonnage.....	128
2.2. Résidus dans les agrumes.....	128
2.3. Classification des échantillons en fonction de leur provenance.....	131
CONCLUSIONS.....	145
BIBLIOGRAPHIE.....	146

